

Beiträge zur Isolierung
einiger Sesquiterpenlactone
und deren
fotochemisches Verhalten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Rieck
aus Stralsund

Berlin 1968

Beiträge zur Isolierung
einiger Sesquiterpenlactone
und deren
fotochemisches Verhalten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Rieck
aus Stralsund

Berlin 1968



1. Referent: Prof. Dr. G. Schenck

2. Referent: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 3.7.1968

Tag der Promotion :

15. JULI 1968

Meinen Eltern und meiner Frau

in Dankbarkeit gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Gerhard Schenck am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin.

Herrn Professor Dr. Gerhard Schenck gilt mein aufrichtiger Dank für das Wohlwollen und die liebenswürdige menschliche und fachliche Unterstützung, die er meinen Studien angedeihen ließ.

Herrn Dr. Manfred Huke bin ich für die wertvollen Anregungen und die stete Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen zu Dank verpflichtet.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. F. Šorm für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften Prag zu danken.

Mein Dank gilt weiterhin den Herren Dr. V. Herout und Dr. L. Novotny, mit denen ich fruchtbare Diskussionen führen durfte.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. EINLEITUNG	1
1. Historischer Überblick und Begriffsdefinitionen	1
2. Pharmakologische Bedeutung der Guaianolide	8
3. Über die Stabilität pflanzlicher Arzneistoffe	10
II. PROBLEMSTELLUNG	12
III. ÜBER DIE GUAIANOLIDE DER MATRICARIA CHAMOMILLA L.	15
1. Die Isolierung von Matricarin	16
1.1. Die Isolierung von Matricarin nach Šorm et al.	17
1.2. Durchführung der Isolierung	18
1.3. Die Beurteilung der einzelnen Extraktionsphasen	19
1.4. Die Ergebnisse der Versuchsreihe	20
2. Versuche zum Auffinden geeigneter Extraktionsmittel	22
3. Eine neuentwickelte Methode zur Isolierung von Matricin und Matricarin	24
3.1. Die Identität des isolierten Matricarins	25
3.2. Modifikation der präparativen Schichtchromatographie	26
3.3. Ergebnisse der Versuchsreihe	27
4. Darstellung der Chamazulencarbonsäure	28
5. Entwicklung einer DC-Methode zur Trennung der Guaianolide	30
6. DC-Untersuchung von handelsüblichen Kamillenpräparaten	31
7. Beiträge zur Untersuchung der fotochemischen Beständigkeit des Matricarins	33
8. Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen an den Guaianoliden der Matricaria chamomilla L.	35
IV. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS DIACETYLLACTUCIN	37
1. Die Darstellung des Lactucins	38
1.1. Die Identität des Lactucins	39

2. Die Acetylierung von Lactucin	39
2.1. Die Identität des Diacetyllactucins	40
3. Versuche zur Hydrolyse-Beständigkeit von Diacetyllactucin	42
4. Über das fotochemische Verhalten von Diacetyllactucin	43
4.1. Die DC-Verfolgung der Zerstörung des Diacetyllactucins durch Lichteinwirkung	44
4.2. Ergebnisse der Versuchsreihe	45
5. Die spektralfotometrische Verfolgung der Zerstörung des Diacetyllactucins durch Lichteinwirkung	46
5.1. Die Ergebnisse der Versuchsreihe	47
6. Die präparative Trennung der Fotoprodukte durch Schichtchromatographie	49
7. Die präparative Darstellung der Fotoprodukte	50
7.1. Die Versuchsbedingungen	50
7.2. Durchführung der Fotoreaktion	51
7.3. Die Trennung der Fotoprodukte ① und ②	51
7.4. Beiträge zur Charakterisierung des Fotoproduktes ①	51
8. Der Einfluß des Lösungsmittels auf die Fotoreaktion	53
8.1. Entwicklung einer Arbeitshypothese	53
8.2. Durchführung der Versuche	55
8.3. Auswertung der Versuchsergebnisse	58
9. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen am Diacetyllactucin	59
V. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS LEUKODIN	60
1. Das Vorkommen und die Charakteristika des Leukodins	60
2. Die Löslichkeit des Leukodins	61
3. DC von Leukodin	61
4. Feststellung der Lichtempfindlichkeit des Leukodins	62
5. Spektralfotometrische Verfolgung der Leukodinzerstörung durch Lichteinfluß	63
6. Der Einfluß der Lösungsmittel bei der Fotoreaktion des Leukodins	64

6.1. Spektralfotometrische Verfolgung der Fotoreaktion	64
6.2. Verfolgung der Leukodinzerstörung durch die DC	67
6.3. Diskussion der Ergebnisse	68
7. Präparative Darstellung eines Leukodin- Fotoproduktes	68
7.1. Die Trennung der Fotoprodukte	69
7.2. Charakterisierung des isolierten Foto- produktes	70
8. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über das Leukodin	72
VI. VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LICHT- EMPFINDLICHKEIT DER GUAIANOLIDE MATRICARIN, LACTUCIN, DIACETYLLACTUCIN UND LEUKODIN	74
VII. ZUSAMMENFASSUNG	76
VIII. EXPERIMENTELLER TEIL	79

EINLEITUNG

I. EINLEITUNG

1. Historischer Überblick und Begriffsdefinitionen

=====

Verschiedene Pflanzen haben die auffällige Eigenschaft ätherische (äth.) Öle zu bilden. Ihre leichte Gewinnungsmöglichkeit förderte das frühzeitige Interesse der Naturwissenschaft an diesen Pflanzenprodukten. Wesentliche Erkenntnisse der verschiedensten Fachsparten gaben stets neue Impulse und führten zur Entwicklung eines komplexen Gebietes in der Naturstoffchemie, der Terpenchemie.

Diesen natürlichen Kohlenwasserstoffen sprach man die Bruttoformel $C_{10}H_{16}$ zu und unterteilte sie willkürlich in "Terpene" - als den flüssigen Anteil - und in "Campher" - als den kristallisierenden Anteil der Öle. Wallach äußerte 1885 die Vermutung, daß diesen Naturstoffen ein gemeinsames Bauprinzip, das Isopren, C_5H_8 , 2-Methylbutadien 1.3, zugrunde liegt. Die große Vielzahl an terpenoiden Verbindungen erklärt sich einerseits durch die Aneinanderknüpfung des Bausteines Isopren und andererseits durch die hierbei auftretende Neigung zur Cyclisierung. Diese zwei Faktoren ermöglichen die Einteilung der Isoprenoide in verschiedene Gruppen, ermöglichen eine übersichtliche Klassifizierung einzelner Verbindungen. Nach der multiplikativen Sequenz des Bausteines ergibt sich die Unterteilung in Mono-, Sesqui-, Di- und Polyterpene. Beachtet man den Cyclisierungsgrad der Verbindungen, werden in den Terpenklassen mono-, bi-, tricyclische Verbindungen unterschieden.

Kerschbaum (1) isolierte 1913 mit dem acyclischen Farnesol das erste Sesquiterpen. Mit der Einführung der Dehydrierungsmethode mittels Schwefel, durch Ruzicka und Meyer (2) 1921, begann auf dem Forschungsgebiet der Sesqui- und der höheren Terpene eine stürmische Entwicklung, die zu unserem heutigen Wissen über eine große Zahl interessanter Verbindungen geführt hat.

1) M. Kerschbaum, Ber. dtsch. chem. Ges. 46, 1732, 1913

2) L. Ruzicka, J. Meyer, Helv. chim. Acta 4, 505, 1921

Schon seit dem 15. Jahrhundert wird das tiefblaue äth. Öl einiger Kompositen erwähnt. Ihre Auffälligkeit war der Anreiz zur Isolierung der Farbstoffkomponente, für die Piesse (3) 1863 den Ausdruck "Azulen" prägte. Kenntnisse über den Charakter dieser Komponente hatte er nicht. 1926 erkannten Ruzicka und Rudolph (4) die Identität der Azulene aus dem Kamillen- und Schafgarbenöl und nannten es Chamazulen. Heubner und Grabe (5) erkannten 1933 die pharmakologische Bedeutung des Chamazulens.

Pfau und Plattner (6) (7) konnten 1936 die Verbindung "Azulen" durch die Strukturaufklärung des Grundskeletts charakterisieren. Mit dem Ausdruck Azulene bezeichnet man seitdem eine Gruppe nichtbenzoider Aromaten, die sich vom Bicyclo-(0.3.5.)-decapentaen (I) ableiten. Das Molekül enthält fünf konjugierte Doppelbindungen in einem katinoiden Siebenring und einem anionoiden Fünfring und weist schwache Dipoleigenschaften auf.

Der Grundzustand des Azulens läßt sich durch folgende mesomere Grenzformeln beschreiben (Abb.1):

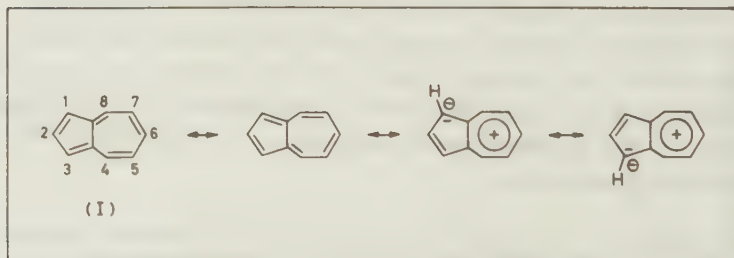
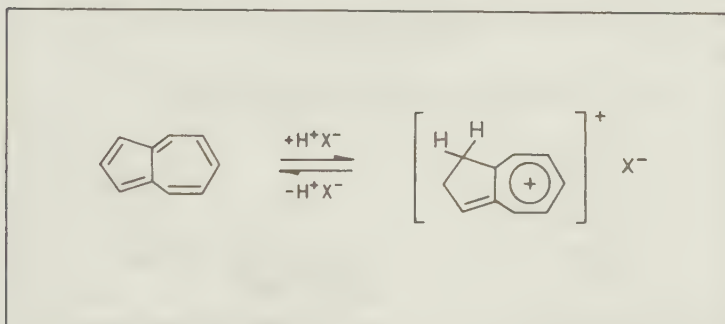


Abb.1: Mesomere Grenzformeln des Azulens

- 3) S. Piesse, Compt. rend. 57, 1016, 1863
- 4) L. Ruzicka, E.A. Rudolph, Helv. chim. Acta 9, 118, 1926
- 5) W. Heubner, F. Grabe, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. 171, 329, 1933
- 6) A. St. Pfau, Pl. Plattner, Helv. chim. Acta 19, 858, 1936
- 7) Pl. Plattner, E. Heilbronner, S. Weber, Helv. chim. Acta 32, 574, 1949

Aus den Ergebnissen der Arbeiten Plattners (7) geht hervor, daß die Azulene basisch reagieren. Sie lösen sich in konzentrierten Säuren unter Anlagerung des Protons in 1-Stellung und Bildung eines Azuleniumkations:



Ungeklärt blieb die Struktur des Chamazulens und die Frage, ob es in der Pflanze genuin gebildet vorliegt oder erst bei der äth. Ölgewinnung unter den Bedingungen der Wasserdampfdestillation aus einer Vorstufe gebildet wird. Koch (8) und Wegner (9) konnten zeigen, daß das Chamazulen nicht als solches im pflanzlichen Material vorliegt, sondern als ein Sekundärprodukt bei der Aufarbeitung aus einem genuinen Precursor entsteht. Die Vorstufe bezeichneten sie als "Azulenbildner", während Neuwald (10) von einem "Proazulen" sprach. Die Natur des Precursors blieb ungeklärt. Diskutiert wurde seine enzymatische Umwandlung zum Chamazulen oder gar eine glykosidische Verbindung. Graham (11) vermutete einen Terpenalkohol als genuinen Chamazulenprecursor. Die unterschiedlichen Ansichten konnten nicht geklärt werden, da den Autoren die Isolierung der Vorstufe in reiner Form und in ausreichender Menge mißlang. Erst Jung und Wendler (12) erbrachten Fortschritte auf dem Wege der Vorstufenisolierung, bis letztlich der tschechische Arbeitskreis die Chamazulen-

8) K. Koch, Arch. Pharmaz. 280, 424, 1942

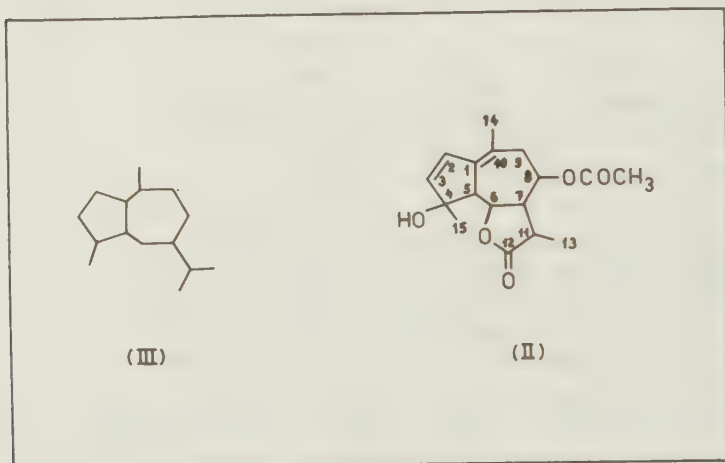
9) E. Wegner, Arch. Pharmaz. 283, 127, 1950

10) F. Neuwald, Süddtsch. Apoth.-Ztg. 88, 362, 1948

11) K. Graham, J. Amer. Pharm. Assoc. 22, 819, 1933

12) F. Jung, M. Wendler, Pharmazie 8, 117, 1953

Precursoren aus dem Absinth (13) und der Kamille (14) isolierten und ihre Strukturen aufklärten. Sie erkannten das Matricin (II) als ein Sesquiterpenlacton, bezeichneten es in der Ableitung vom Guaian-Skelett (III) als ein Guaianolid und konnten es nach der chemischen Nomenklatur als ein 4-Hydroxy-8-acetoxy-guaia-2,1(10)dien-6,12-olid benennen.



Die Definition "Guaianolid" für ein azulenoides Sesquiterpenlacton ergibt sich aus der formalchemischen Ableitung von einem monocyclischen Molekül mit einem Zehnring und einer Lactongruppe. Je nach dem wie in diesem Zehnringmolekül, dem Grundskelett der Germacranolide, eine neue Bindung aufgebaut wird, erhalten wir die bicyclischen Sesquiterpenlactone vom Eudesman- oder Guaiantyp (Tabelle 1).

- 13) V. Herout, L. Dolejš, F. Šorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 18, 854, 1953
 14) Z. Čekan, V. Herout, F. Šorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 19, 798, 1954

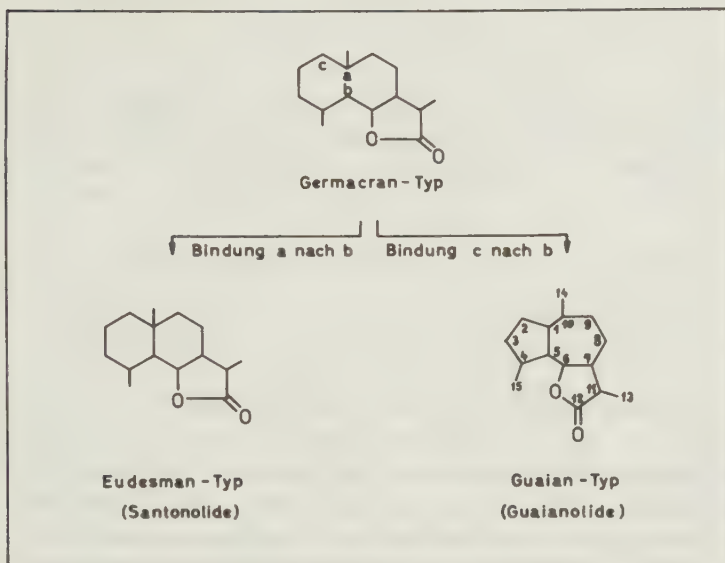


Tabelle 1: Formalchemische Ableitung der Guaianolide

Mit dem Auffinden des Matricins und des Artabsins (13) konnte letztlich auch die Konstitutionsformel des Chamazulens belegt werden. Es besitzt die nach der Isoprenkupplungsregel anormale Formel $C_{14}H_{16}$ und ist ein 1,4-dimethyl-7-äthylazulen (IV) (15) (16).

Mit der Klärung des Fragenkomplexes nach dem genuinen Precursor des Chamazulens ließ sich die leicht ablaufende Umwandlung der Vorstufe Matricin zum Chamazulen formulieren (Abb. 2) und damit die anormale Formel des Chamazulens verstehen. Die bei dieser Umwandlung als instabiles Zwischenprodukt gebildete Chamazulencarbonsäure (V) konnte Stahl in kristalliner Form aus der *Achillea millefolium* (17) und der *Matricaria chamomilla* (18) isolieren.

15) F. Šorm, J. Novak, V. Herout, Collect. czechoslov. chem. Commun. 18, 527, 1953

16) A. Meisels, A. Weizmann, J. Amer. chem. Soc. 75, 3865, 1953

17) E. Stahl, Chem. Ber. 87, 202, 1954

18) E. Stahl, Chem. Ber. 87, 505, 1954

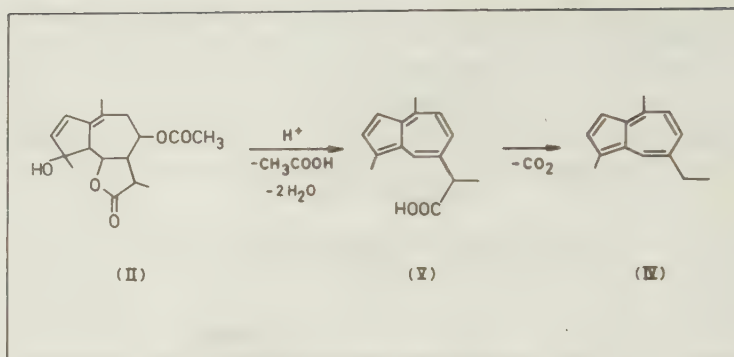


Abb.2: Die Umwandlung des Precursors Matricin zum Chamazulen

Die weitergehende systematische Untersuchung der Kompositen erbrachte eine Vielzahl von analogen Sesquiterpenlactonen, die teilweise als Azulenprecursoren angesprochen werden konnten. Sie lieferten unter den Bedingungen der Wasserdampfdestillation oder durch drastischere Dehydrierung Azulene. Vorstufen, zum Beispiel die Guaianolide, die aufgrund ihrer Strukturunterschiede nicht unmittelbar Azulen liefern, müssen aber wegen biogenetischer Zusammenhänge zu den genuinen Azulenprecursoren gerechnet werden. So sprach man häufig von Prochamazulenen und Prochamazulenogenen (bezogen auf das Endprodukt Chamazulen), ohne daß damit eine Klassifizierung der Verbindungen möglich war. Tétényi und Mitarbeiter (19) versuchten einen Überblick zu geben: Sie bezeichneten wasserdampfvlüchtige Vorstufen als Prochamazulene oder bei Nichtflüchtigkeit als Prochamazulenogene. Die Autoren gaben eine Zusammenfassung ihrer Definitionen, wie sie die Abb. 3 zeigt.

19) P. Tétényi, E. Tyihak, J. Sváb, J. Mathé, Pharmazie 17, 463, 1962

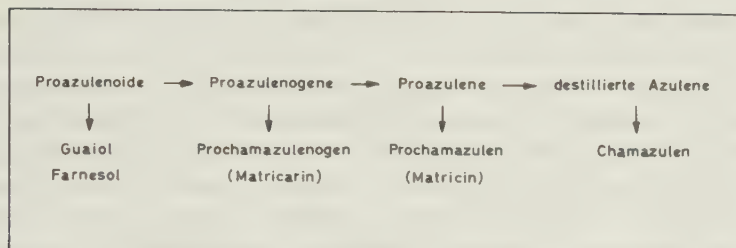
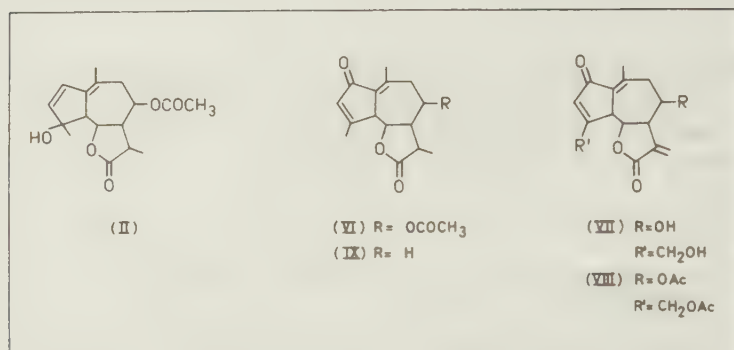


Abb.3: Gruppierung pflanzlicher Azulene (bezogen auf Chamazulen)

Die Tabelle beinhaltet eine biogenetische Reihenfolge dieser Stoffe im Isoprenoid-Stoffwechsel, für die die Autoren keinen Beweis erbrachten. Sie selbst benutzten die Definitionen ebenfalls nicht konsequent und wiesen gleichzeitig auf ihre Unelastizität hin. Diese Begriffe haben sich in der Literatur nicht durchgesetzt.

Übersichtlicher erscheint mir der von Herout und Šorm (14) vorgeschlagene Weg, indem sie - wie am Beispiel Matricin gezeigt wurde - azulenoide Sesquiterpenlactone als Guaianolide bezeichneten. Dieser Begriff hat sich heute in der Literatur zur Benennung solcher Verbindungen eingebürgert. Unberücksichtigt bleibt hierbei die Stellung der Sesquiterpenlactone zur Azulenbildung und die Bedingungen ihrer Umwandlung.

Die Sesquiterpenlactone Matricin (II), Matricarin (VI), Lactucin (VII), Diacetyllactucin (VII) und Leukodin (IX) sind definitionsgemäß zum Guaiantyp zu zählen und werden im Rahmen dieser Arbeit diskutiert.



2. Pharmakologische Bedeutung der Guaianolide

Sesquiterpenlactone der Guaianolidreihe sind von pharmakologischem Interesse. Sie verkörpern die genuinen Vorstufen des antiphlogistisch wirksamen Chamazulens oder die bitteren Prinzipien der Kompositeninhaltsstoffe.

Den zentralen Punkt meiner Arbeit bildet der Bitterstoff Lactucin bzw. seine Diacetylverbindung. Für vergleichende Untersuchungen in der Reihe der Stabilitätsprüfungen interessieren weiterhin Matricarin und Leukodin, die in ihrem Molekül das gleiche chromophore System der zweifach α, β ungesättigten Carbonylgruppe wie das Lactucin aufweisen. Die chemische Struktur wird, wie später gezeigt wird, in den Mittelpunkt der Stabilitätsbetrachtungen zu rücken sein. Diese Struktur ergibt den kausalen Zusammenhang für die Diskussion der betreffenden Guaianolide aus verschiedenen Pflanzen der Kompositenfamilie.

Der Bitterstoff Lactucin (VII), C₁₅H₁₆O₅, ist der pharmakologische Wirkungsträger des Milchsaftes der Komposite *Lactuca virosa* L. Der getrocknete Milchsaft, Lactucarium genannt, wurde seit altersher als sedativwirkendes, hustenreizstillendes Arzneimittel appliziert. Die Wirkung des

Lactucins bzw. des Lactucariums (20) (21) (22) (23) (24) unterscheidet sich von der Wirkung der Opiate als Hustenmittel grundsätzlich dadurch, daß die Expectorations nicht gehemmt wird - was von außerordentlicher Bedeutung bei der Behandlung von an Tbc-erkrankten Patienten ist - und keine Obstipation auftritt. Trotz der Namensgebung *Lactuca virosa* war in den pharmakologischen Testversuchen keine Toxizität dieses natürlichen, stickstofffreien Arzneimittels zu beobachten.

Die Wirkungsunsicherheit dieses Naturstoffes verhinderte jedoch, trotz seiner Vorzüge, daß er sich bis heute als Arzneimittel in der Therapie halten konnte. Zahlreiche Untersuchungen über die Wirkungsunsicherheit des Lactucins und des Lactucariums erbrachten keine befriedigende Klärung (25) (26) (27).

Matricarin (VI), $C_{17}H_{20}O_5$, begleitet den Chamazulenprecursor Matricin in sehr geringer Konzentration in den Blütenköpfchen der *Matricaria chamomilla* L.

Das Matricarin ist ebenfalls als eine Azulenvorstufe aufzufassen. Der Naturstoff ist jedoch aus zwei Gründen in pharmakologischer Sicht ohne Bedeutung: Seine Konzentration in der Pflanze ist sehr gering und seine Umwandlung erfolgt erst nach der Reduktion mit Lithium-Aluminium-Hydrid und anschließender Dehydrierung. Die Reaktion liefert als Umwandlungsprodukte Artem- und Linderazulen.

Leukodin (IX), ein Guaianolid aus der *Artemisia Leukodes* Schrenk, weist die Summenformel $C_{15}H_{18}O_3$ auf. Es besitzt kein pharmakologisches Interesse und gelangt in dieser Arbeit nur aufgrund seiner, dem Lactucin analogen Struktur,

- 20) A.W. Forst, Münch. med. Wschr. 32, 1251, 1937
21) O. Eichler, H.G. Scholz, Klin. Wschr. 19, 517, 1940
22) G. Schenck, H. Graf, Arch. Pharmaz. 275, 36, 1937
23) A. W. Forst, Arch. exp. Pathol. 195, 1, 1940
24) H.A. Oelkers, Med. Klinik 1940, 1391
25) G. Schenck, H. Graf, Arch. Pharmaz. 274, 537, 1936
26) G. Schenck, Münch. med. Wschr. 32, 1250, 1937
27) A. Schmitt, Botan. Archiv. 40, 516, 1940

zur Diskussion.

3. Über die Stabilität pflanzlicher Arzneistoffe

=====

Auch für unser Zeitalter, der Zeit überwiegend synthetischer Arzneimittel, ist die Arzneipflanze und ein daraus isolierter, pharmakologisch wertvoller Naturstoff von Bedeutung (28). Vor seiner Applikation als Arzneimittel, gleichgültig ob als Gesamtdrogenextrakt oder Reinsubstanz, steht die Gewinnung des Naturstoffes, steht die Extraktion des Wirkstoffes oder der Wirkprinzipien. Bei der Aufarbeitung von pflanzlichem Material erfolgt eine mehr oder weniger weitgehende Zerstörung des Ausgangsproduktes, so daß im ersten Extrakt das Vorliegen der Wirkungskomponente neben Ballast- und Begleitstoffen zu verzeichnen ist.

An dieser Stelle würden erste Stabilitätsuntersuchungen mit einem großen Fragenkomplex einsetzen:

- a) Beeinflussen die Ballaststoffe die Wirkstoffe in ihrer Stabilität und ihrem Wirkungscharakter und sind Wechselreaktionen zwischen den einzelnen, extrahierten Verbindungen zu verzeichnen?
- b) Welchen Einfluß üben allgemeine äußere Bedingungen, wie der Luftsauerstoff und das Licht, auf die Stabilität der Wirkstoffe aus? Oder besitzen einzelne Extraktivstoffe unter diesen Bedingungen eine sensibilisierende Wirkung?

Da das Lactucarium (als Gesamtdrogenextrakt) und das Lactucin (als Reinsubstanz) wegen ihrer Wirkungsunsicherheit aus dem Arzneischatz verschwanden, wurden zahlreiche Untersuchungen zum Auffinden der Ursache durchgeführt (25) (26) (27). Diese Arbeiten erbrachten keine Klärung.

28) R. Hänsel, Dtsch. Apotheker-Ztg. 107, 1534, 1967

Die Ursache der Unbeständigkeit der Lactucinwirkung wurde erst 1964 aufgedeckt, als in diesen Untersuchungen das Licht als Umweltfaktor miteinbezogen wurde.

So wird das fotochemische Verhalten der beschriebenen Guaianolide das zentrale Problem meiner Untersuchung darstellen.

II. PROBLEMSTELLUNG

G. Schenck, M. Huke und Th. Naumann (29) erkannten 1964, daß die Ursache der Unbeständigkeit in der großen Lichtempfindlichkeit des Lactucins beinhaltet ist. Die Autoren konnten nach der Bestrahlung einer wässrigen Lactucinlösung zwei Foto-Folgeprodukte isolieren, wobei das 1. Folgeprodukt auch aus einer bestrahlten methanolischen Lösung anfiel. Dieses Produkt wurde als ein Isomeres des Lactucins erkannt, von dem vermutet wurde, daß es sich durch das Fehlen einer Doppelbindung im Siebenring unterschied.

Das 2. Folgeprodukt wurde durch die fotochemische Addition von Wasser an die Doppelbindung im Siebenring des Lactucins gebildet, wobei zwei Anlagerungsmöglichkeiten diskutiert wurden (Abb.4).

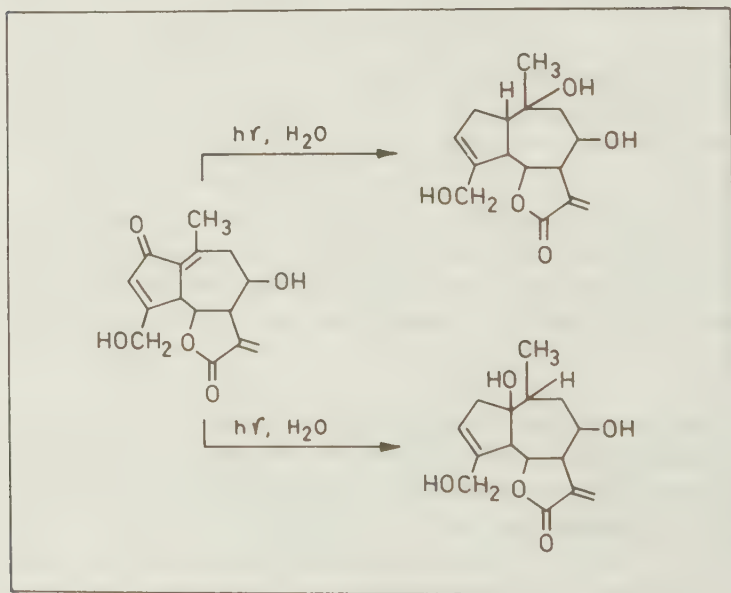


Abb.4: Formulierten Strukturmöglichkeiten eines fotochemisch gebildeten Lactucin-Wasseradduktes (29)

29) G. Schenck, M. Huke, Th. Naumann, Arch. Pharmaz. 297, 703, 1964

Zur Klärung der Struktur der Folgeprodukte erarbeiteten die Autoren mehrere Beiträge. Die neue Lage der Doppelbindung im 1. Fotoprodukt konnte nicht bestimmt werden. In weiteren, unveröffentlichten Untersuchungen wurde versucht eine Aufklärung der Struktur durch das Heranziehen von NMR-Spektren zu ermöglichen. Zur Aufnahme der Spektren lösten sich die Fotoprodukte nur in Dimethylsulfoxid in ausreichender Konzentration. Die notwendige Anwendung von Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel erlaubte aber wiederum keine eindeutige Diskussion der erzielten Spektren. Durch die Acetylierung der fotochemischen Folgeprodukte wurde nun versucht die Anwendung von Dimethylsulfoxid zu umgehen und zum Chloroform als Lösungsmittel zu gelangen. Eine Acetylierung der Fotoprodukte - und damit das Erreichen der gewünschten Löslichkeit in Chloroform - gelang jedoch nicht.

1. Aus dem Mißlingen der Acetylierung der zwei Fotoprodukte des Lactucins ergab sich die erste Aufgabestellung meiner Arbeit: Das Ausgangsprodukt Lactucin ist vor der Durchführung einer Fotoreaktion zu acetylieren und das fotochemische Verhalten von Diacetyllactucin ist zu untersuchen.

Die Fotoreaktion des Lactucins ist eine Reaktion der in diesem Guaianolidmolekül enthaltenen zweifach α,β -ungesättigten Carbonylgruppe. Durch die Einbeziehung der struktur-analogen Sesquiterpenlactone Matricarin und Leukodin hoffe ich zu einer grundlegenden Aussage über die Lichtempfindlichkeit, über die Stabilität dieser Substanzen zu gelangen.

2. Der zweite Ausgangspunkt meiner Arbeit ist durch das Isolierungsverfahren von Matricin und Matricarin gegeben. Der tschechische Arbeitskreis (14) (30) konnte diese Naturstoffe nur aus einer sehr großen Drogenmenge isolieren. Meine Aufgabe ist es, mit Hilfe moderner präparativer Methoden aus kleineren Ausgangsmengen authentisches Material herzustellen. Das isolierte Matricarin stände der unter 1. geforderten Versuchsreihe zur Verfügung. Das ebenfalls anfallende Matricin wird als authentisches Material für

30) Z. Čekan, V. Procházka, V. Herout, F. Šorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 24, 1554, 1959

die Entwicklung eines allgemeinen dünn-schicht-chromatographischen (DC) Verfahrens Verwendung finden. Die zu entwickelnde DC-Methode soll eine gültige Identifizierung der in Kamillen-extrakten und -präparaten enthaltenen chamazulenoiden Verbindungen ermöglichen, ihre genaue und schnelle Zuordnung erlauben und eine Aussage über das Vorhandensein oder Fehlen dieser Verbindungen gewähren. Mit der Entwicklung eines allgemein gültigen DC-Verfahrens zur Auftrennung chamazulenoider Verbindungen könnte zu den erheblichen Unstimmigkeiten in der betreffenden Literatur Stellung bezogen werden.

UBER DIE GUAIANOLIDE DER MATRICARIA CHAMOMILLA L.

III. ÜBER DIE GUAIANOLIDE DER MATRICARIA CHAMOMILLA L.

Die Suche nach der genuinen Vorstufe des Chamazulens wurde durch den tschechischen Arbeitskreis (14) mit der Isolierung und der Konstitutionsaufklärung des Matricins (II) abgeschlossen. Bei der Drogenaufarbeitung wurde das Matricarin (VI) als ein weiteres, in geringer Konzentration begleitendes Guaianolid isoliert und in seiner Konstitution erkannt.

Die bis heute bekannt gewordenen Charakteristika dieser Naturstoffe sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bruttoformel	Matricin $C_{17}H_{22}O_5$	Matricarin $C_{17}H_{20}O_5$
Molekulargewicht	306,3	304,3
Schmp. °C	158-160	193-195
$[\alpha]_D^{20}$	-131°	+23°
UV-Spektrum λ_{max} (nm) log ϵ	244 4.22	255 4.218
IR-Spektrum ν (cm ⁻¹)	1783 γ -Lacton 1744 Acetoxy- gruppe 3440 Hydroxyl- 3590 gruppe	1793 γ -Lacton 1745 Acetoxy- 1250 gruppe 1693 zweifach α, β un- gesättigte Keto- gruppe im Fünf- ring 1645 zwei konjugierte 1623 C=C-Bindungen

Tabelle 2: Charakteristika von Matricin und Matricarin (30)

Die Guaianolide Matricin und Matricarin wurden in weiteren Kompositen gefunden oder erwiesen sich mit anderen Guaianoliden als identisch. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick:

Matricin	Matricarin
<i>Matricaria chamomilla</i> L. (14)	<i>Matricaria chamomilla</i> L. (30)
<i>Artemisia caruthii</i> (31)	<i>Artemisia tilesii</i> Ledeb. (32)
	<i>Achillea lanulosa</i> (33)

Tabelle 3: Das Vorkommen von Matricin und Matricarin

1. Die Isolierung von Matricarin

=====

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung von Matricarin bietet sich die Droge *Artemisia tilesii* Ledeb. an, da sie im Gegensatz zur *Matricaria chamomilla* L. das Guaianolid in erheblich größerer Konzentration enthält. In dieser Droge liegt das Matricarin nicht als begleitender, sondern als Hauptinhaltsstoff vor. Dieses ideale pflanzliche Ausgangsmaterial stand mir leider nicht zur Verfügung, da Drogenmuster über den Handel nicht zu erhalten waren. Nach Herz und Ueda (32) wird der Standort der Pflanze mit dem Nordwesten der Vereinigten Staaten von Amerika, Kanada und Alaska angegeben.

So verblieb zur Matricarin-Darstellung als Ausgangsmaterial die Kamillendroge und der von Šorm et al. (30) entwickelte Isolierungsweg.

Als Nachteil dieser Methode ist die benötigte große Ausgangsmenge an Drogenmaterial zu erwähnen. Die Nacharbeitung dieser Methode sollte mir erstmals ⁺⁾ Matricarin in die Hände geben, eine Beurteilung des Isolierungsweges ermöglichen und

31) J.C. Spitzner, C. Steelink, J. pharmac. Sci. 56, 650, 1967

32) W. Herz, K. Ueda, J. Amer. chem. Soc. 81, 1139, 1961

33) E.H. White, E.R.K. Winter, Tetrahedron Letters [London] 1963, No 3, 137

+) Zu einem späteren Zeitpunkt erhielt ich einige Milligramm Matricarin als Vergleichsmuster vom Institut für Organische Chemie und Biochemie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften Prag. Den Herren Šorm, Herout und Procházka bin ich für die Überlassung der Probe zu Dank verpflichtet.

letztlich zu einer Darstellungsmethode führen, die die Isolierung von Matricarin aus kleineren Drogenmengen erlaubt.

1.1. Die Isolierung von Matricarin nach Šorm et al. (14) (30)

Aus Petrolätherextrakten isolierten die tschechischen Autoren die Guaianolide Matricin und Matricarin, indem sie die Naturstoffe aus dem Petrolätherextrakt über eine verdünnte Kaliumbicarbonat-Lösung in Äther überführten. Der Rückstand der Ätherphase ergab nach Kristallisationsansätzen Matricin.

Matricarin wurde durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid aus den anfallenden Mutterlaugen gewonnen. Durch diese Aufarbeitung des Kamillenextraktes wurde eine Zerstörung der Guaianolide durch saure Extraktivstoffe verhindert, eine grobe Reinigung und eine Stoffanreicherung erzielt.

Die Isolierungsabschnitte habe ich in der Tabelle 4 schematisch dargestellt.

Die Aufarbeitung von pflanzlichen Extrakten läßt sich häufig nur in beschränktem Ausmaße durch physikalische Kriterien bewerten, da es bei der Aufarbeitung nur in den seltensten Fällen gelingt reine und mehr oder weniger mit einem Inhaltsstoff angereicherte Extraktionsphasen darzustellen. Deshalb benutzte ich als Wertaussage über die Isolierungsstufen die DC-Methode und die mit einem geringeren Aussagewert behaftete Gehaltsbestimmung an Chamazulen und ging von der Arbeitshypothese aus: Ist im Verlauf der Aufarbeitung eine durch DC verfolgbare Anreicherung an Matricin oder eine Reinigung erreicht worden, wird auch das begleitende Matricarin sich entsprechend verhalten, selbst wenn es aufgrund seiner geringeren Konzentration in den einzelnen Phasen nicht direkt faßbar sein sollte.

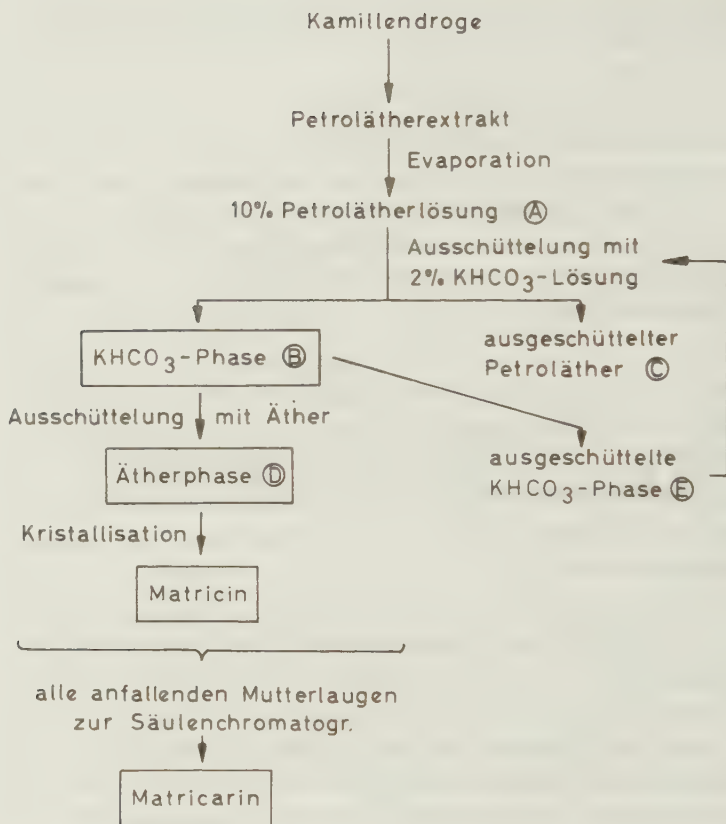


Tabelle 4: Schema der Extraktion nach Šorm et al. (14) (30)

1.2. Durchführung der Isolierung

Die aufzuarbeitende fränkische Kamillendroge war von bester Qualität. Sie bestand aus großen Blütenkörbchen, enthielt wenig Grus und die EP-Reaktion nach E. Stahl (34), als eine Vorprobe auf azulenoide Verbindungen, verlief positiv. Als Mittelwerte für den äth. Ölgehalt wurden 0,9 Prozent (%) und für den Chamazulengehalt im äth. Öl 0,051 % gefunden.

34) E. Stahl, Dtsch. Apotheker-Ztg. 93, 197, 1953

Die äth. Ölbestimmung erfolgte durch Wasserdampfdestillation in der Neo-Clevenger-Apparatur. Das im Öl enthaltene Chamazulen wurde spektralfotometrisch erfaßt. Für die Extraktgewinnung aus 5 kg getrockneten, gemahlenen Kamillenblüten benutzte ich ein kombiniertes Mazerations-Perkolationsverfahren. Die Extraktion wurde unter Lichtausschluß und bei Zimmertemperatur durchgeführt und lieferte den Petrolätherextrakt (A). Er wurde schematisch nach Tabelle 4 aufgearbeitet und lieferte die Phasen (B), (C), (D) und (E).

1.3. Die Beurteilung der einzelnen Extraktionsphasen

Zur Beurteilung wurden die entsprechenden Phasen einer Gehaltsbestimmung an Gesamtazulen unterzogen. Die erzielten Ergebnisse sind mit einer bestimmten Problematik behaftet, die wegen ihrer Grundsätzlichkeit an dieser Stelle diskutiert werden muß. Bei der Chamazulenbestimmung sind folgende zwei Faktoren zu beachten:

- a) Erfolgt die Gehaltsbestimmung mit der Neo-Clevenger-Apparatur und der Wasserdampfdestillation, so wird eine Gesamtazulenbestimmung durchgeführt, indem die Vorstufe Matricin eine Umwandlung zum nichtgenuinen Azulen erfährt.
- b) Soll der reine Azulengehalt von Kamillenpräparaten, die noch zusätzlich Proazulen enthalten, bestimmt werden, so muß eine vorangehende Trennung von Proazulen (Matricin) und Azulen erfolgen. In einer Pentanausschüttelung des Präparates wird das Proazulen durch eine Säulenchromatographie an Aluminiumoxid entfernt. Im blauen Pentandurchlauf wird der Azulengehalt dann spektralfotometrisch festgehalten.

Da ich nur einen Überblick über die wasserdampfvlüchtigen Proazulene erhalten wollte, bediente ich mich der Wasserdampfdestillation als Konventionsmethode des DAB 7 (Monographien) und führte eine Gesamtazulenbestimmung durch. Hierbei wurde das eventuell schon bei der Extraktaufarbeitung durch Umwandlung aus einer Vorstufe gebildete

Chamazulen und das noch vorhandene, genuine Proazulen erfaßt. Gemessen wurde nur der Anteil des überdestillierten Stoffgemisches, der in Xylol löslich und in Wasser unlöslich war. Die Bestimmung des Azulengehaltes erfolgte spektralfotometrisch bei der Wellenlänge 605 nm. Zur Berechnung des Gehaltes diente die von Kaiser und Frey (35) angegebene Formel. Die Werte dieser Bestimmungen sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Phase	Gehalt Chamazulen (%)	EP.Reaktion (34)
Droge	0,051	+
A	0,83	+
B	0,75	+
C	0,021	±
D	0,7	+
E	0,009	-

Tabelle 5: Chamazulengehalt der Extraktionsphasen

Zur Wertbestimmung der Isolierungsabschnitte wurde weiterhin eine DC-Untersuchung durchgeführt. Die Phasenrückstände wurden an Kieselgel HF 254 mit Äther/Benzol als Laufmittel chromatographiert. Die Ergebnisse sind in der Abb. 5 zusammengestellt.

1.4. Die Ergebnisse der Versuchsreihe:

- a) Die DC-Bilder (Abb. 5) zeigen deutlich das Verhalten von Matricin im Aufarbeitungsweg. Sie lassen die Reinigung und Anreicherung erkennen. Die Werte der Gehaltsbestimmungen sind nicht so charakteristisch. Sie zeigen, daß eine Anreicherung erfolgte, weisen aber auch darauf

35) H. Kaiser, H. Frey, Dtsch. Apotheker-Ztg. 54, 882, 1939 und Dtsch. Apotheker-Ztg. 57, 155, 1942

Adsorbens:		Kieselgel HF ₂₅₄		1= Matricin	
Laufmittel:		Benzol / Äther 1:1 (V/V)		2= Chamazulen	
Laufstrecke:		12 cm		gr=grün ; h bl=hellblau	
Detektion:		UV 254 nm; EP-Reag. 100°; 5'		br=braun; h gr=hellgrün	
				ro=rosa ; viro=violettrosa	
				grbl=grünblau	
A		B		C	
D		E			
UV254	EP	UV254	EP	UV254	EP

Abb. 5: DC-Beurteilung der Extraktionsphasen

hin, daß sich die Extraktionsschritte nicht quantitativ vollziehen lassen und Verluste in Kauf zu nehmen sind. Eine reine Matricinphase erhielt ich außerdem erst, nachdem der Rückstand (D) eine weitere Reinigung durch präparative Schichtchromatographie erfuhr.

- Wie ein späterer Vergleich mit authentischem Material zeigte, konnte kein Matricarin im Chromatogramm beobachtet werden.
- Aus den, bei Kristallisationsversuchen mit dem Matricin in Aceton/Diiso-propyläther, anfallenden Mutterlaugen konnte durch Säulenchromatographie - entsprechend der

Vorschrift - kein Matricarin isoliert werden. Die eingesetzte Drogenmenge von 5 kg Kamillenblüten dürfte als zu gering anzusehen sein.

- d) Als unangenehme Eigenschaft der Guaianolide muß hervorgehoben werden, daß sie selbst aus reinen Lösungen nicht oder nur schwer auskristallisierten.

2. Versuche zum Auffinden geeigneter Extraktionsmittel

Extraktionsversuche wurden mit geeignet erscheinenden Lösungsmitteln durchgeführt. Als Kriterium wählte ich die Gehaltsbestimmung an Gesamtazulen, die DC und die Reaktion mit dem EP-Reagens.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt und beziehen sich auf die jeweils gleiche Drogenausgangsmenge von 500 g.

Extraktionsmittel	Gewicht (g) und Eigenschaft der Extrakt rückstände	Chamazulen %	EP-Reaktion
Benzol	48; viskos, grün	0,48	±
Petroläther	40; viskos, hellgelb	0,75	+
Chloroform	49; viskos, gelbgrün	0,69	+
Äther	60; viskos, gelbgrün	0,82	+
50% Methanol	52; viskos, grün	0,78	+
50% Äthanol	57; viskos, gelbgrün	0,70	+

Tabelle 6: Beurteilung verschiedener Extraktionsmittel

Die Gehaltsbestimmungen zeigen deutliche Unterschiede, die durch die Ergebnisse der DC in ihrem Aussagewert gemindert werden. Nicht die mehr oder weniger gute Löslichkeit des zu isolierenden Stoffes im eingesetzten Lösungsmittel scheint die primäre Rolle zu spielen, sondern die Extrak-

tionskraft des Lösungsmittels zu anderen Inhalts- und Ballaststoffen und das Absorptionsverhalten der Guaianolide an diesen Extraktivstoffen. Zur Problematik der Azulengehaltsbestimmung sind zahlreiche Veröffentlichungen erschienen (8) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43).

Kunert (44) wies bereits darauf hin, daß sich Äther- und Petrolätherextrakte nur in ihren Mengen unterschieden. Äther als Extraktionsmittel lieferte eine größere Extraktmenge (bezogen auf gleiche Drogen-Ausgangsmenge) und enthielt 90% Gesamtproazulen gegenüber 60% Gesamtproazulen im Petrolätherextrakt. Wurden die Proazulengehalte jedoch auf die erzielten Extraktmengen bezogen, ergaben sich keine Gehaltsunterschiede.

Durch das Nichtlösen von harzartigen Stoffen, Wachsen und Chlorophyll im Petroläther - Substanzen an denen Proazulen adsorbiert sein kann - ist von vornherein keine vollständige Extraktion der Proazulene zu erwarten. Aus zwei Gründen ist aber trotzdem der Petroläther als ein gutgeeignetes Extraktionsmittel anzusehen. Er erleichtert außerordentlich das chromatographische Arbeiten durch das weitgehende Fehlen der genannten Ballaststoffe und es werden immerhin noch mehr als 60% des vorhandenen Proazulens erfaßt.

Aufgrund meiner Erfahrungen erschien mir Methanol neben Petroläther als Extraktionsmittel ebenfalls gut geeignet. Da das Verhalten von Matricarin im Extraktionsmittel Methanol ebenso unklar blieb wie im Petroläther, bewogen mich die Vorzüge des Petroläthers ihn weiterhin als Lösungsmittel einzusetzen.

- 36) H. Spengler, G. Weisflog, *Pharmac. Acta Helvetiae* 22, 190, 1947
37) H. Kaiser, W. Lang, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 91, 163, 1951
38) H. Kaiser, G. Hasenmaier, *Scientia Pharmac.* 24, 155, 1956
39) G. Schenck, K.H. Frömming, A. Schmitt, *Arch. Pharmaz.* 289, 200 u. 312, 1956
40) A. Grahle, Chr. Höltzel, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 103, 1401, 1963
41) B. Störba, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 102, 832, 1962
42) G. Schwerdfeger, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 103, 874, 1963
43) H. Schilcher, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 104, 1019, 1964
44) G. Kunert, *Pharmazie* 6, 549, 1951

3. Eine neuentwickelte Methode zur Isolierung von Matricin und Matricarin

Ein Kamillenblütenextrakt wurde nach 1.2. aufgearbeitet. Den Phasenrückstand (D) löste ich im Verhältnis 1:3 in Benzol und unterzog ihn einer präparativen Schichtchromatographie. In der Abb. 6 ist das nach zweimaliger Entwicklung erhaltene Chromatogramm wiedergegeben. Es zeigt deutlich die noch vorhandenen Verunreinigungen des Rückstandes (D). Dadurch erklärte sich die Schwierigkeit der Matricin-Isolierung nach 1.2. und das schlechte Kristallisationsvermögen dieser Verbindung. Durch kombinierte Detektion mit

Adsorbens: Kieselgel HF ₂₅₄ Laufmittel: 1. Benzol/Äther 1:1 (V/V) 2. Benzol/Äther 1:1 (V/V) Laufstrecke: ca. 17 cm Detektion: UV 254 nm; EP-Reag.			② Matricin ④ Matricarin ⑤ Furankörper? (mit EP Rotfärbg.) ⑨ Chamazulen
nach d. Entwicklung (ohne Detektion)	EP	UV 254	
⑩ buttergelb			
⑨ hellblau			
⑧ orange	braun		
⑦ grün	dunkelgrün		
⑥ gelb			
⑤ gelb-grün	rot	rot	
④ gelb	grün-violett	dunkelblau	
③	bräunlich		
② gelb	grün	dunkelblau	
① gelb-weiß			

Abb. 6: Schichtchromatographische Auftrennung des Rückstandes (D).

UV-Licht von 254 nm und dem EP-Reagens wurde das Chromatogramm in Zonen aufgeteilt, die getrennt von der Platte abgehoben wurden. Die Zonen wurden mit Äther extrahiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die DC-Beurteilung der gewonnenen Rückstände zeigte in der Zone (2) Matricin und in der Zone (4) Matricarin.

3.1. Die Identität des isolierten Matricarins

Nach der Umkristallisation von Matricarin aus Aceton/Diisopropyläther wurde der Schmelzpunkt bei 193°C gefunden. Ein Mischschmelzpunkt mit dem Prager Vergleichsmuster zeigte keine Depression. Das UV-Spektrum (Abb.7) wurde in 95%igem Äthanol aufgenommen und wies ein Maximum bei 256 nm auf (log ϵ 4.2).

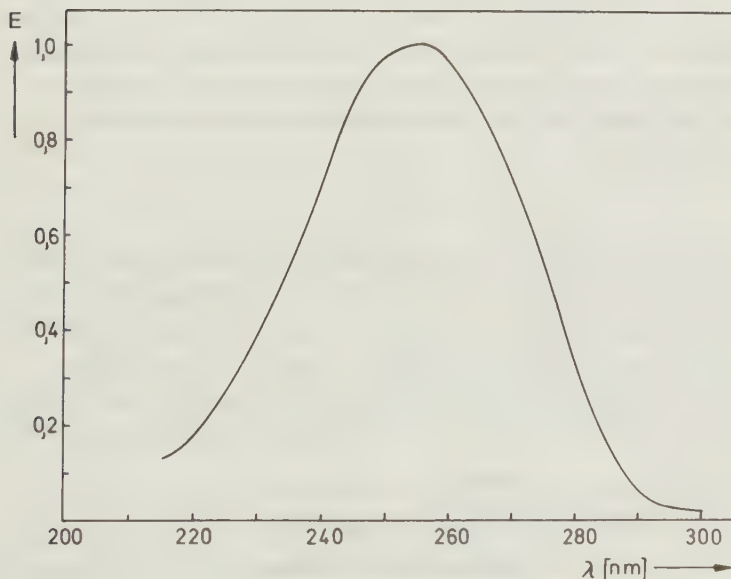


Abb.7: UV-Spektrum Matricarin (95% Äthanol)

Die Abb. 8 gibt das IR-Spektrum (KBr) mit folgenden Banden wieder: 1792 (γ -Lacton), 1750 1240 (Acetoxygruppe), 1690 (zweifach α, β ungesättigte Ketogruppe im Fünfring) und 1625 1645 (zwei konjugierte C=C-Doppelbindungen).

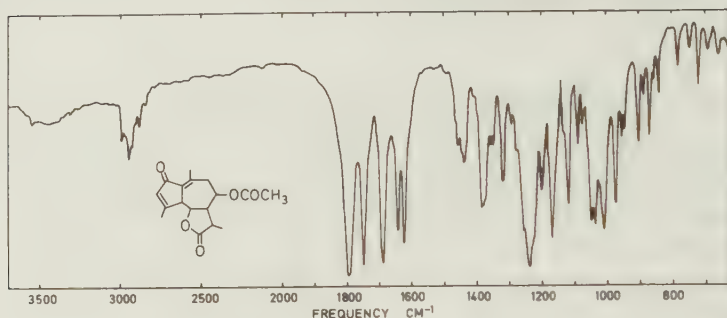


Abb.8: IR-Spektrum Matricarin (KBr)

Ein Vergleich der aufgefundenen Daten mit den Literaturwerten (Tabelle 2) ergab völlige Übereinstimmung. Danach konnte die Identität und Reinheit des Matricarins als gesichert gelten.

3.2. Modifikation der präparativen Schichtchromatographie

Durch eine Modifikation der schichtchromatographischen Methode konnte bei einem erneuten Isolierungsansatz auf eine Vorreinigung und Anreicherung nach 1.2. verzichtet werden. Der Petrolätherextrakt (A) wurde unmittelbar chromatographiert. Eine Auftrennung erfolgte durch Mehrfachentwicklung in:

- 1) Benzol
- 2) Benzol
- 3) Benzol + 10 % Äther
- 4) Benzol + 30 % Äther
- 5) Benzol + 40 % Äther

Durch die zweifache Entwicklung in Benzol erfolgte die Abtrennung der Ballaststoffe von den Guaianoliden. Dieser Ab-

schnitt stellte die Reinigungs- und Anreicherungsphase dieser Methode dar. Begleit- und Ballaststoffe wurden zum oberen Plattenrand getrieben, während azulenoide Verbindungen um die Startzone liegen blieben. Erst die Mehrfachentwicklung mit steigendem Ätheranteil im Laufmittel bewirkte die Trennung der Guaianolide. Ich erhielt ein Chromatogramm, das mit der Abb. 6 übereinstimmte. Die Aufarbeitung der Zone (2) lieferte Matricin. Aus der Zone (4) erhielt ich nach einer Kristallisation die geringe Menge von 14,3 mg Matricarin.

3.3. Ergebnisse der Versuchsreihe:

Die Aufarbeitung von Kamillenextrakten durch die neuentwickelte Methode der präparativen Schichtchromatographie lieferte mir Matricin und Matricarin als authentisches Material. Nach der Feststellung der charakterisierenden Daten für das Matricarin und dem Vergleich mit den Literaturwerten, war seine Identität belegt (siehe auch 3.1.).

Matricin ist für die Versuche zur Feststellung des fotochemischen Verhaltens der Guaianolide durch das Fehlen der zweifach α, β ungesättigten Carbonylgruppe ohne Bedeutung. Es sollte nur als Vergleichsmuster für chromatographische Untersuchungen dienen. Aus diesen Gründen verzichtete ich auf seine schwierige Kristallisation. Einen indirekten Identitätsnachweis führte ich durch seine Umwandlung mittels der Wasserdampfdestillation zum Chamazulen. Da nur Matricin unter diesen Bedingungen eine Umwandlung erfährt, kann seine Identität indirekt nachgewiesen werden und als gesichert gelten, wenn im DC ein neugebildeter Chamazulenfleck nachweisbar ist.

Die Abb. 9 zeigt, daß nach der Destillation die Intensität des Matricinfleckes (R_1) stark sank, während ein neuer Chamazulenfleck (R_2) gebildet wurde. Dieser Fleck stimmte im R_f -Wert mit dem einer Chamazulenvergleichsprobe überein.

Die Aufarbeitung von Kamillenextrakten lieferte mir Matricin und Matricarin als authentisches Material. Um in den Besitz

sämtlicher azulenoider Verbindungen zu kommen, erwarb ich Chamazulen-Reinsubstanz und isolierte außerdem nach E. Stahl (18) die Chamazulencarbonsäure aus einem Kamillen-extrakt.

Adsorbens:	Kieselgel HF ₂₅₄	a = Matricin - Vergleichssubstanz
Laufmittel:	Benzol/Äther 1:1 (V/V)	b = Chamazulen - Vergleichssubstanz
Laufstrecke:	12 cm	R ₁ = isoliert. Matricin
Detektion:	UV 254 nm; EP-Reag.	R ₂ = durch Umwandlung gebild. Chamazulen

Abb.9: DC der Umwandlung von Matricin zum Chamazulen

4. Darstellung der Chamazulencarbonsäure =====

Chamazulencarbonsäure wurde als instabiles Zwischenprodukt bei der Umwandlung von Matricin zu Chamazulen von E. Stahl (18) aus der Kamille isoliert. Diese Methode zur Darstellung der Chamazulencarbonsäure arbeitete ich nach.

Ein Chloroformextrakt wurde mit 1 n alkoholischer Lauge

versetzt und kurz auf 50°C erwärmt, wobei sich der Ansatz rotbraun verfärbte. Der Extrakt wurde mit Wasser verdünnt und mit Petroläther ausgezogen. Die filtrierte, wässrige Phase brachte ich mit Phosphorsäure auf den pH von 4 bis 5. Der Farbstoff, der sich gebildet hatte, wurde mit Petroläther ausgeschüttelt, wieder in Lauge aufgenommen und durch eine kurze Schicht Aluminiumoxid filtriert. Den Vorlauf verwarf ich, fing dann den Hauptdurchlauf auf, säuerte ihn an und schüttelte die Chamazulencarbonsäure mit Pentan aus.

Der Rückstand der Pentanausschüttelung war ein viskoser, tiefblauer Ölfilm, der nach Ansäuern und Wasserdampfdestillation Chamazulen lieferte. Die Abb. 10 zeigt die DC-Kontrolle der Umwandlung der Chamazulencarbonsäure zum Chamazulen.

Adsorbens:	Kieselgel HF ₂₅₄	1 = isoliert. Chamazulencarbonsäure
Laufmittel:	Benzol/Äther 1:1(W/V)	2 = Chamazulen-Vergleichssubst.
Laufstrecke:	12cm	R ₂ = durch Umwandlung gebildetes Chamazulen
Detektion:	UV 254 nm; EP-Reag.	
② ①	--- ①	R₂ ①

Abb.10: DC der Umwandlung von Chamazulencarbonsäure zum Chamazulen

5. Entwicklung einer DC-Methode zur Trennung der Guaianolide =====

Matricin, Matricarin, Chamazulen und Chamazulencarbonsäure wurden dünn-schichtchromatographisch im Laufmittel Äther/Benzol 1:1 (V/V) getrennt. Verwendete ich als Adsorbens Kieselgel HF 254, konnte zur Detektion UV-Licht der Wellenlänge 254 nm herangezogen werden. Das EP-Reagens ermöglichte durch eine Blaufärbung die Identifizierung von Matricin, Chamazulen und Chamazulencarbonsäure, jedoch nicht von Matricarin. Ohne jegliche Detektion waren die schon blaugefärbten Flecken von Chamazulen und Chamazulencarbonsäure zu beobachten.

Die Trennung der Guaianolide ist in der Abb. 11 wiedergege-

Adsorbens: Kieselgel HF ₂₅₄ Laufmittel: Benzol/Äther 1:1(V/V) Laufstrecke: 12 cm Detektion: UV 254 nm; EP-Reag.						
Trennung der Vergleichssubst.	Vergleichssubstanz.				Durch Schichtchromatogr. isoliert	
	Ch'-carbons.	Ma-tricin	Matri-carin	Cham-azulen	Matricin	Matricarin
④				④ d-blau		
③			③			③
②		② blau-grün			②	
①	blau ①					
UV 254 + EP	EP	EP	UV 254	EP	EP	UV 254

Abb.11: DC-Trennung der Kamillen-Guaianolide

ben. Die Rf-Werte waren für: Chamazulencarbonsäure 0.06, Matricin 0.25, Matricarin 0.4 und Chamazulen 0.85. Die gefundenen Rf-Werte wiesen die für die DC übliche Reproduzierbarkeit auf.

6. DC-Untersuchung von handelsüblichen Kamillenpräparaten =====

Zur chromatographischen Untersuchung von Kamillenextrakten oder -präparaten sind zahlreiche Untersuchungen erschienen (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51). Die Autoren gelangten in ihren Arbeiten meistens nur zur Bestimmung des leicht erkennbaren Chamazulens.

Tétényi (19) versuchte papierchromatographisch, aufgrund unterschiedlicher Färbungen mit dem Carr-Price-Reagens als Detektionsmittel, eine Einteilung und Zuordnung der genuinen Vorstufen zu ermöglichen. Ich verwendete das gleiche Detektionsmittel bei dünnschichtchromatographischen Arbeiten und erhielt auf den DC-Platten nicht entsprechende Ergebnisse.

Auch die Hinweise zur Deutung einiger Flecke im DC nach Gräb (51) konnte ich durch den Einsatz von authentischem Vergleichsmaterial nicht bestätigen.

Mit der unter 5. entwickelten DC-Methode lassen sich sämtliche azulenoiden Verbindungen in Kamillenpräparaten erfassen.

Als handelsübliche Präparate wurden a) Azulon ^R, b) Kamillosan ^R, c) Chamulen ^R, und d) Extr. Cham. fld. Erg.-B. 6 (eigene Herstellung) dünnschichtchromatographisch

- 45) O. Knessl, A. Vlastiborova, Collect. czechoslov. chem. Commun. 19, 782, 1954
- 46) V. Sykora, K. Vokac, Collect. czechoslov. chem. Commun. 25, 1702, 1960
- 47) E. Thyihak, J. Sárkány-Kiss, J. Mathé, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland 102, 128, 1963
- 48) H. Kaiser, Arch. Pharmaz. 287, 503, 1954
- 49) L. Hörhammer, H. Wagner, B. Salfner, Arzneimittel-Forsch. 13, 33, 1963
- 50) Jaspersen-Schibs 1961, Hörhammer et al. im DAB 7 - Ost
- 51) R. Gräb, Dtsch. Apotheker-Ztg. 103, 1424, 1963

untersucht. Die Abb. 12 zeigt die erzielten Chromatogramme, während die Ergebnisse in der Tabelle 7 wiedergegeben sind.

Adsorbens: Kieselgel HF ₂₅₄ Laufmittel: Benzol/Äther 1:1(V/V) Laufstrecke: 12cm Detektion: UV 254 nm; EP-Reag.				
Azulon®	Kamillosan®	Chamulen®	Extr. Cham. fld. Erg. B.6	Vergleichs- substanz.
				 Chamazulen
				 Matricarin
				 Matricin
				 Ch'-carbons.

Abb. 12: DC von handelsüblichen Kamillenpräparaten

Ergebnisse der Versuchsreihe:

Präparat	Matricin	Matricarin	Chamazulen	Chamazulen- carbonsäure
a) Azulon®	+	-	+	-
b) Kamillosan®	+-	-	+	-
c) Chamulen®	+	-	+	-
d) Extr. Cham. fld.Erg.-B.6	+	-	+	+

Tabelle 7: Zusammenstellung der DC-Auswertung

In allen Präparaten wurde Chamazulen und Matricin gefunden,

letzteres in stark variierender Konzentration. Matricarin wurde nicht beobachtet.

Aus Azulon ^(R) und Chamulen ^(R) konnte durch präparative Schichtchromatographie Chamazulen und in geringer Ausbeute Matricin gewonnen werden. Damit wurden aber keine neuen Ausgangsmaterialien zur Isolierung von Matricin und Chamazulen aufgefunden, denn die Ausbeuten beim Einsatz von frischen Drogenextrakten lagen erheblich höher.

7. Beiträge zur Untersuchung der fotochemischen Beständigkeit des Matricarins

=====

7.1. Da mir wegen der schwierigen Isolierung des Matricarins nur wenige Milligramm dieses Guaianolides zur Verfügung standen, konnte ich über die Lichtempfindlichkeit dieser Substanz nur einige orientierende Versuche anstellen. Diese zeigten jedoch, daß das Matricarin eine äußerst lichtlabile Substanz ist. Bei einer auf der DC-Platte durchgeführten Fotoreaktion ließen sich die neugebildeten Flecke zweier Folgeprodukte erkennen, während die Intensität des Matricarin-Fleckes erheblich abnahm (Abb. 13). Die Rf-Werte für die zwei Fotoprodukte betrugen:

Rf-Wert 1. Fotoprodukt	:0,6
Rf-Wert 2. Fotoprodukt	:0,7
Rf-Wert	Matricarin :0,43

Adsorbens	Kieselgel GF ₂₅₄	1=1. Fotoprodukt			
Laufmittel:	Benzol/Äther 1:1 (V/V)	2=2. " "			
Laufstrecke	12 cm				
Detektion:	UV 254 nm				
Konzentration	20 g				
Matricarin Prager Vergleichsmu- ster	Matricarin isoliert (3.1.)	Bestrahlungszeit (min) →			
		1	3	5	7
					
					
					

Abb. 13: DC-Verfolgung der Matricarinzerstörung durch
Lichteinwirkung

7.2. Die Matricarin-Zerstörung konnte auch spektralfotometrisch verfolgt werden. Die UV-Spektren des Matricarins vor und nach einer Bestrahlung sind in der Abb. 14 wiedergegeben. Deutlich ist zu erkennen, daß das Maximum des Matricarins (λ max. 256 nm) in seiner Intensität abnimmt. Es kommt zur Ausbildung eines neuen Maximums bei der Wellenlänge von 230 nm. Eine hypsochrome Verschiebung des ursprünglichen Maximums um 26 nm ist zu verzeichnen.

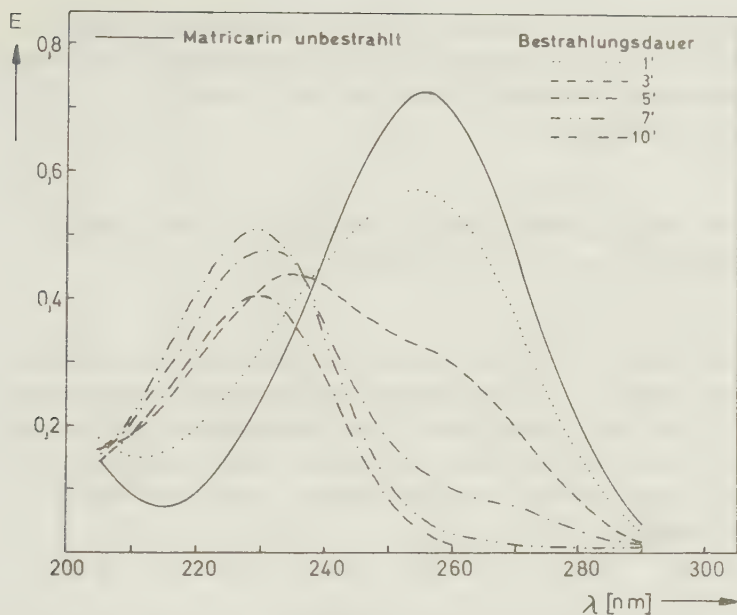


Abb.14: Spektrofotometrische Verfolgung der Matricarinzerstörung

7.3. Ergebnisse der Versuchsreihe:

Matricarin ist eine lichtlabile Substanz und wird unter Lichteinfluß zerstört. Die Fotoreaktion läßt sich durch die DC und spektrofotometrisch verfolgen. Das Matricarin-Maximum im UV-Spektrum erfährt eine hypsochrome Verschiebung um 26 nm.

8. Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen an den Guaianoliden der *Matricaria chamomilla* L.

8.1. Nach der von Šorm et al. (14) (30) vorgeschlagenen Aufbereitung von Petrolätherextrakten der Kamillendroge zur Gewinnung von Matricin und Matricarin konnte ich das letztere Guaianolid darstellen. Der Isolierungsweg wurde durch die

DC und durch die indirekte Gehaltsbestimmung an Proazulen einer Beurteilung unterzogen. Die Anreicherung und Reinigung des Matricins ließ sich mit diesen Methoden gut im Aufarbeitungsschema verfolgen.

8.2. Die Eignung verschiedener Lösungsmittel zur Kamillenextraktdarstellung wurde diskutiert.

8.3. Ich entwickelte eine Methode der präparativen Schichtchromatographie, die zur Aufarbeitung kleiner Drogenmengen und zur Isolierung der Guaianolide geeignet ist. Matricarin konnte in reiner, kristalliner Form dargestellt werden, während das Matricin in angereicherter, praktisch reiner Lösung gewonnen wurde.

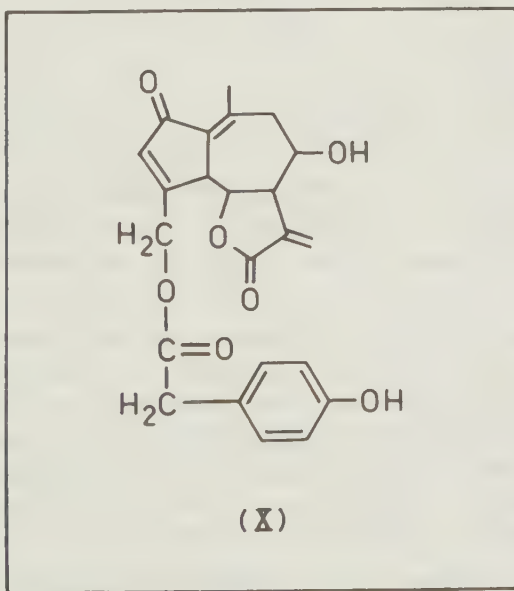
8.4. Die azulenoiden Verbindungen der Kamille (Matricin, Matricarin, Chamazulencarbonsäure und Chamazulen) konnte ich dünnschichtchromatographisch auftrennen. Die von mir beschriebene DC-Methode ist geeignet, Aussagen über das Vorhandensein dieser azulenoiden Substanzen in Kamillenpräparaten zu tätigen.

8.5. Ich konnte zeigen, daß Matricarin eine außerordentlich lichtempfindliche Substanz ist. UV-Spektren von Matricarin vor und nach einer Fotoreaktion wurden gegeben.

UNTERSUCHUNGEN UBER DAS DIACETYLLACTUCIN

IV. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS DIACETYLLACTUCIN

Lactucin wurde zum erstenmal durch Ludwig und Kronmayer (52) aus dem Lactucarium isoliert, während Zellner und Riechling (53) dieses Guaianolid in der Cichoria intybus L. fanden. Geeignete Isolierungsmethoden wurden durch Schenck und Mitarbeiter (54) für das Lactucarium und durch Holzner und Zinke (55) für die Cichoriawurzel erarbeitet. Schenck und Graf (54) gelang es auch die Summenformel und das Molekulargewicht festzulegen. Die endgültige Strukturaufklärung erfolgte gleichzeitig und unabhängig durch Dolejš et al. (56) und durch Barton und Narayanan (57).



- 52) H. Ludwig, A. Kronmayer, Arch. Pharmaz. 100, 1, 1847 und 161, 1, 1862
 53) I. Zellner, J. Riechling, Mh. Chem. 47, 695, 1926
 54) G. Schenck, E. Späth, W. Schreiber, Arch. Pharmaz. 277, 203, 1939
 55) K. Holzner, A. Zinke, Mh. Chem. 84, 901, 1953
 56) L. Dolejš, M. Soucek, M. Horak, V. Herout, Chem. and Ind. 1958, 530
 57) D.H.R. Barton, C.R. Narayanan, J. chem. Soc. [London] 1958, 963

Dolejš und Mitarbeiter (58) äußerten die Vermutung, daß erst bei der Aufarbeitung von pflanzlichem Material das Lactucin durch Hydrolyse aus einem weiteren Bitterstoff der Komposite *Lactuca virosa* L., dem Lactucopikrin (X), gebildet wird.

Schenck, Huke und Naumann (29) erkannten 1964 in der Lichtlabilität des Lactucins den Grund seiner Wirkungsunsicherheit. Die Autoren konnten bei der Bestrahlung des Lactucins zwei Foto-Folgeprodukte isolieren, ein Isomerisierungsprodukt (1. Folgeprodukt) und ein Wasseraddukt (2. Folgeprodukt).

Neue pharmakologische Untersuchungen werden eine Aussage ermöglichen, ob der sedative Effekt des Lactucins durch seine Foto-Isomerisierung beeinflusst wird.

1. Die Darstellung des Lactucins

=====

Zwei Ausgangsmaterialien bieten sich für den von Schenck und Mitarbeiter (54) entwickelten Isolierungsweg an:

- a) Das Lactucylpulver der Knoll AG stand nur in geringerer Menge zur Verfügung, da der Giftlattich in Deutschland nicht mehr angebaut wird.
- b) Da G. Schenck (59) neue Anbaugelände in der Türkei und in Indien erschließen konnte, stand auch der eingedickte Milchsaft neuerer Ernten zur Verfügung. Der Milchsaft wird bei der Ernte unter Berücksichtigung der von Naumann gefundenen Erkenntnisse durch sofortige Gefriertrocknung unter Lichtausschluß zum eigentlichen, pulverigen Ausgangsprodukt aufgearbeitet.

Setzte ich letzteres Produkt zur Lactucinerstellung ein, so erhielt ich höhere Ausbeuten als beim Einsatz von Altvorräten an Lactucylpulver.

Die Aufarbeitung dieser beiden Ausgangsprodukte lieferte ein hellbraunes, amorphes, hygroskopisches Pulver, das Rohlactucin.

- 58) F. Šorm, L. Dolejš, Guaianolides and Germacranolides S. 37
Actualités scientifiques et industrielles 1309
Hermann Paris 1965
- 59) G. Schenck, Dtsch. Apotheker-Ztg. 107, 1516, 1967

Nach einer von Reubert (60) entwickelten Methode lieferte das Rohlactucin, nach vorheriger Behandlung mit Aktivkohle und adsorptiver Filtration an Aluminiumoxid, durch mehrfaches Umkristallisieren Reinlactucin.

1.1. Die Identität des Lactucins

1.1.1. Die weißen, glänzenden Kristallschuppen des Reinlactucins schmolzen bei 221°C (Die Literaturwerte weisen Schwankungen zwischen 213° und 233°C auf).

1.1.2. Die isolierte Substanz wies zwischen 300 und 200 nm den für Lactucin charakteristischen Verlauf der Absorptionskurve auf. Das Maximum, gebildet durch die zweifach α, β ungesättigte Ketogruppe im Fünfring, lag bei 259 nm (H_2O) und bei 255 nm (95%iger Äthanol, $\log \epsilon$ 4.24).

1.1.3. Das IR-Spektrum, aufgenommen in KBr, zeigte die für das Guaianolid Lactucin charakteristischen Banden bei cm^{-1} : 3392 3235 (OH-Gruppen), 1768 (γ -Lacton), 1672 (zweifach α, β ungesättigte Ketogruppe im Fünfring), 1632 1615 (zwei C=C-Bindungen, konjugiert zur Carbonylgruppe).

1.1.4. Im Dünnschichtchromatogramm mit Kieselgel HF 254 als Adsorbens und dem Laufmittel Butylacetat/Äthylacetat 85:15 (V/V) zeigte das Lactucin nur einen Fleck (R_f -Wert 0.25).

Der Vergleich der gefundenen Charakteristika mit den Literaturangaben (29) (Schmp. $213^{\circ} - 217^{\circ}\text{C}$, λ_{max} 257 nm, $\epsilon = 14.000$) bewies die Reinheit und Identität des isolierten Lactucins.

2. Die Acetylierung von Lactucin

=====

Lactucin (VII) besitzt im Molekül zwei Hydroxylgruppen, eine primäre alkoholische Gruppe am C_4 und eine sekundäre am C_8 ,

60) W. Reubert, Dissertation Freie Universität Berlin 1956

womit für Acylierungsreaktionen zwei Angriffspunkte gegeben sind.

Das Diacetylderivat (VIII) des Lactucins wurde erstmals von Späth und Mitarbeiter (61) beschrieben. Sie gewannen diese Verbindung, indem sie Lactucin bei Zimmertemperatur der Einwirkung von Pyridin - Essigsäureanhydrid aussetzten. Zur Darstellung von Diacetyllactucin benutzte ich diese Methode.

Lactucin wurde in frischdestilliertem, absolutem Pyridin gelöst und nach dem Zusatz von Essigsäureanhydrid vier Stunden lang unter Eiskühlung und zwei Stunden bei Zimmertemperatur unter häufigem Umschwenken stehengelassen. Das tiefbraune Reaktionsgemisch wurde in kleinen Anteilen unter kräftigem Rühren in Eiswasser gegossen. Es bildete sich ein flockiges, graues Pulver, das nicht nach der Vorschrift von Späth (61) mit Äther ausgeschüttelt wurde, sondern auf einer Nutsche gesammelt und gewaschen wurde. Nach dem Trocknen erhielt ich ein grau-weißes Pulver, das nach mehrmaliger Kristallisation reines Diacetylprodukt in einer Ausbeute von 33 - 35 % lieferte. Die Mehrfachkristallisation hat gegenüber der Ätherausschüttelung den Vorteil, daß eine vorzeitige Kristallausscheidung nicht auftreten kann.

2.1. Die Identität des Diacetyllactucins

2.1.1. Das isolierte Diacetyllactucin zeigte einen scharfen Schmelzpunkt bei 162°C (Literaturwert $159^{\circ} - 166^{\circ}\text{C}$).

2.1.2. Die Abb. 15 zeigt das Absorptionsspektrum des Diacetyllactucins, das weitgehend mit dem des Lactucins übereinstimmte. Die zwischen 300 - 200 nm aufgenommene Kurve besitzt ein Maximum bei 253 nm ($\log \epsilon$ 4.15, in 95 % MeOH).

61) E. Späth, R. Lorenz, H. Kuhn, Mh. Chem. 82, 114, 1951

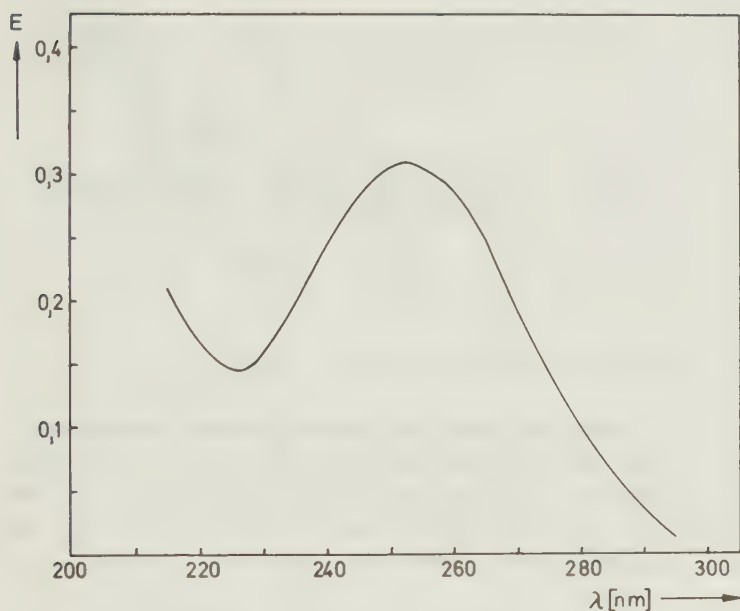


Abb. 15: UV-Spektrum Diacetyllactucin (95 % MeOH)

2.1.3. Die Abb. 16 zeigt das in KBr aufgenommene IR-Spektrum. Bei 3332 und 3235 cm^{-1} wurden die für OH-Gruppen typischen Banden nicht wahrgenommen. Als charakterisierende Banden wurden beobachtet bei cm^{-1} für: 1781 (γ -Lacton), 1740 1230 (Acetoxygruppe), 1695 (zweifach α, β ungesättigte Ketogruppe), 1645 1630 ($\text{C}=\text{C}$ -Bindungen, konjugiert zur Carbonylgruppe).

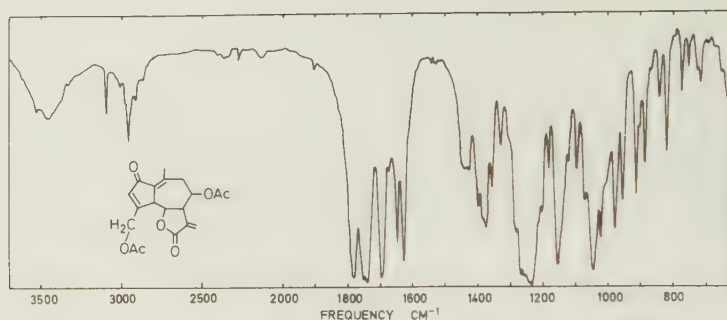


Abb.16: IR-Spektrum Diacetyllactucin (KBr)

2.1.4. In DC-Untersuchungen mit verschiedenen Laufmitteln wurde für das Diacetyllactucin stets nur ein Fleck beobachtet. Im Laufmittel Butylacetat/Äthylacetat 85:15 (V/V) und Kieselgel GF 254 als Adsorbens lag der Rf-Wert für Diacetyllactucin bei 0.45 (für Lactucin bei 0.25).

Danach konnte es als gesichert gelten, daß das für die folgenden Untersuchungen zur Feststellung der Lichtempfindlichkeit verwendete Diacetyllactucin als Reinsubstanz vorlag.

3. Versuche zur Hydrolyse-Beständigkeit von Diacetyllactucin

Diacetyllactucin wurde einerseits in wässrigem Methanol und zum anderen in verdünnter Essigsäure gelöst und unter Lichtausschluß bei Zimmertemperatur stengelassen. In bestimmten Zeitintervallen wurden entnommene Proben dünnschichtchromatographisch untersucht. Drei Tage alte Proben wurden zusätzlich 30 Minuten lang auf 100° C erhitzt, ohne daß das Chromatogramm Hydrolyseprodukte zeigte. Aus der Abb. 17 geht hervor, daß unter den beschriebenen Bedingungen keine Hydrolyse auftrat. Im Chromatogramm wurde kein neugebildeter Lactucinfleck beobachtet.

Adsorbens: Kieselgel GF ₂₅₄		* Diac.-Lc. = Diacetyllactucin		
Laufmittel: Butylazetat/Äthylazetat				
Laufstrecke: 12 cm		85:15 (V/V)		
Detektion: UV 254 nm;		Konzentration: 20 g		
		Folin-Ciocalteu-Reag.		
Diac.-Lc.-Lsg. frisch bereit	3Tg. im Dkl.	Diacetyllactucin 1Tg. i. Tg.-licht bei Tg.-licht im Dunkeln chromatogr.		
				
				

Abb.18: Über die Lichtempfindlichkeit des Diacetyllactucins

4.1. Die DC-Verfolgung der Zerstörung des Diacetyllactucins durch Lichteinwirkung

Auf die Startlinie einer Kieselgel GF-Platte wurden in regelmäßigen Abständen 20 γ Diacetyllactucin aufgetragen und in steigenden Zeiteinheiten einer UV-Bestrahlung ausgesetzt. Die exakte Bestrahlungsdauer für die betreffenden Startflecken wurde durch das Abdecken der Restplatte mit schwarzem Papier erzielt. Die Abb. 19 zeigt Ausschnitte eines nach der Bestrahlung entwickelten Chromatogrammes. Die Bestrahlungszeit reichte von Null bis fünf Minuten.

Nach dreieinhalb Minuten wurde keine Intensitätssteigerung der neugebildeten Flecken beobachtet. Nach einer Bestrahlungsdauer von fünf Minuten war der Diacetyllactucin-Fleck auf der DC-Platte vollständig verschwunden. Eine Ausdehnung der Bestrahlungszeit über fünf Minuten hinaus erschien nicht zweckmäßig, da eine weitergehende Zerstörung der Fotoprodukte ① und ② zu verzeichnen war.

Das Hauptprodukt der Fotoreaktion scheint die Verbindung ① zu sein. Die beobachteten Rf-Werte lauten für:

Diacetyllactucin 0.45

Produkt ① 0.375

Produkt ② 0.33

Produkt ③ 0.0, Produkt ④ 0.12 und Produkt ⑤ 0.06.

Diese Rf-Werte stimmen nicht mit dem des Lactucins oder dessen Fotoprodukten überein.

5. Die spektralfotometrische Verfolgung der Zerstörung des Diacetyllactucins durch Lichteinwirkung

=====

Zur Verfolgung der Fotoreaktion stellte ich eine 0,1%ige Diacetyllactucin-Lösung (in 95%igem Methanol) als Stamm- und Kontrolllösung her. Diese Lösung wurde im Dunkeln aufbewahrt und lieferte durch entnommene Proben und deren Verdünnung die entsprechenden Meß-, Bestrahlungs- und Kontrolllösungen.

Zur Verfolgung der Fotoreaktion wurden Proben der Stammlösung zur 0,05%igen Lösung mit 95%igem Methanol verdünnt und der Lichteinwirkung eines UV-Brenners über bestimmte Zeiteinheiten ausgesetzt. Zur Bestrahlung befanden sich die Lösungen in Bechergläsern von 50 ml Volumen, von denen vier Stück unter dem Brenner Platz fanden. Sämtliche Reaktionsbedingungen wurden innerhalb der Versuchsreihe konstant gehalten. Vor der Entnahme von Proben aus den bestrahlten Lösungen wurden verdunstete Lösungsmittelmengen ergänzt. Die Proben wurden zu Meßlösungen (10γ/ml) verdünnt. Die Änderung des Diacetyllactucin-Spektrums nach der Bestrahlung

von einer bis 15 Minuten wurde in der Abb. 20 festgehalten.

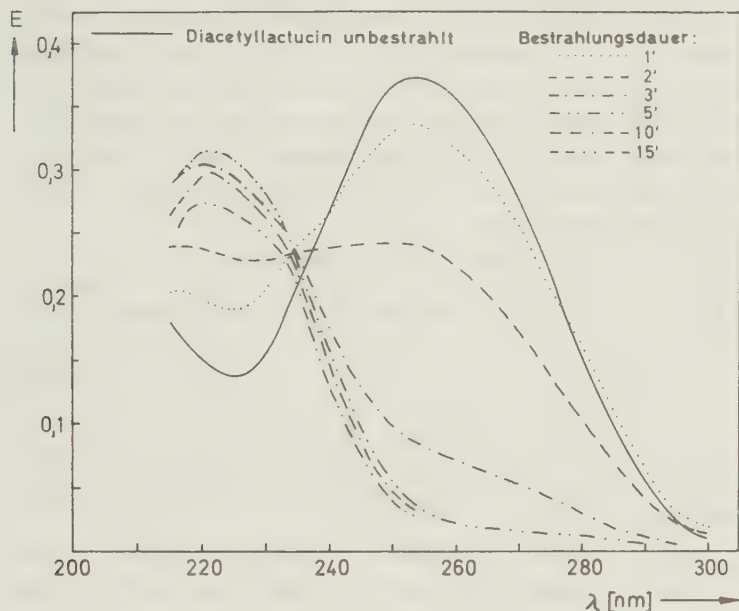


Abb.20: Spektralfotometrische Verfolgung der Diacetyllactucin-Zerstörung

5.1. Die Ergebnisse der Versuchsreihe

Die aufgezeichnete Kurvenschar (Abb. 20) verläuft während des ersten Bestrahlungsstadiums annähernd durch einen isosbestischen Punkt, dessen Lage bei 230 - 235 nm festgehalten wurde. Das Maximum der Diacetyllactucin-Absorptionskurve (λ 252,5 nm) erfährt eine hypsochrome Verschiebung um 32,5 nm. Das neue Spektrum der Fotoprodukte wird kontinuierlich aufgebaut und weist bei der Wellenlänge 220 nm ein neues Maximum auf.

Da die Fotoreaktion sehr rasch verläuft, wurde eine weitere Versuchsreihe mit kürzeren Zeitintervallen durchgeführt. Die beschriebenen Ergebnisse wurden bestätigt. Die Lage des isosbestischen Punktes wurde bei 235 nm fixiert.

Die tabellarische Zusammenstellung der Meßergebnisse (Abb. 21) und die Abb. 22 verdeutlichen die schnelle Zerstörung des Diacetyllactucins. Zwar waren nach einer Bestrahlungsdauer von 2 Minuten noch 60% des Diacetyllactucins vorhanden, aber schon nach einer 3 - 4 minütigen Bestrahlung war die praktisch vollständige Zerstörung des Guaianolides zu verzeichnen. Wurde die Bestrahlungszeit über 10 Minuten ausgedehnt, so setzte eine weitergehende Zerstörung der gebildeten Fotoprodukte ein.

Bestrahlungsdauer [min.]	E λ 252,2 nm	E- Abnahme	E λ 220 nm	E- Zunahme	E-unbe- strahlte Kon- trollsg. λ 252,5
0	0,379	-	0,152	-	0,378
1	0,338	0,041	0,201	0,049	0,377
2	0,243	0,136	0,240	0,088	0,378
3	0,089	0,290	0,305	0,153	0,379
5	0,040	0,339	0,314	0,162	0,377
10	0,039	0,340	0,300	-	0,375
15	0,062	0,317	0,276	-	0,379
20	0,050	0,329	0,241	-	0,380
30	0,023	0,356	0,124	-	0,376

Abb.21: Tabellarische Zusammenstellung der Meßwerte der Versuchsreihe 5

In der Abb. 22 ist die Zerstörung des Diacetyllactucins in Abhängigkeit von der Zeit wiedergegeben.

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte ich zeigen, daß die Ausbildung des neuen Absorptionsmaximums bei 220 nm mit einem steilen Extinktionsabfall im Bereich des Diacetyllactucins verbunden ist. DC-Untersuchungen zahlreicher bestrahlter Guaianolidlösungen zeigten, daß das Diacetyllactucin praktisch quantitativ zerstört war, wenn die Extinktion seines Maximums unter 10% des ursprünglichen Wertes

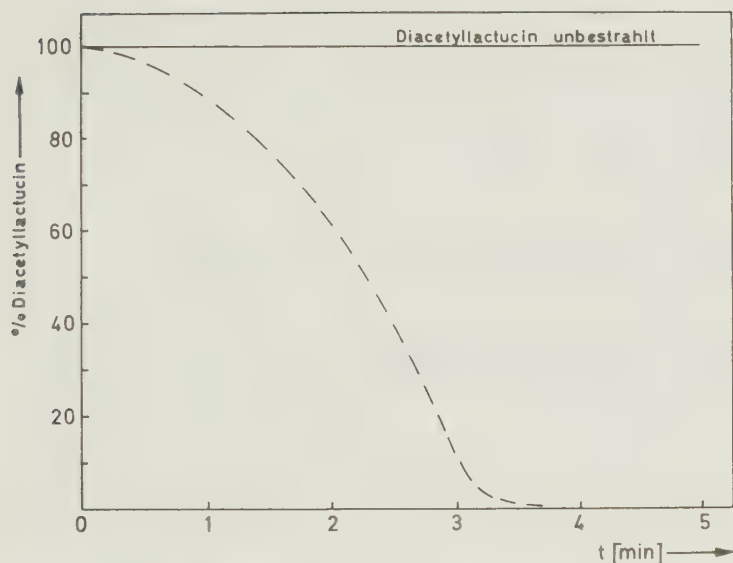


Abb.22: Zeitverlauf der Diacetyllactucin-Zerstörung

abgesunken war. So wurde nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten die vollständige Guaianolidzerstörung verzeichnet. Die zu diesem Zeitpunkt gemessene Extinktion im neugebildeten Maximum des fotochemischen Reaktionsproduktes erreichte ihren höchsten Wert.

6. Die präparative Trennung der Fotoprodukte durch Schichtchromatographie

=====

Durch die Schichtchromatographie mit Kieselgel HF 254 als Adsorbens und dem Laufmittel Äther/Benzol 80:20 (V/V) konnte ich die zwei Fotoprodukte vom eingesetzten Diacetyllactucin und den gebildeten Artefakten trennen. Die Bestrahlungszeit wurde so gewählt, daß hauptsächlich das Fotoprodukt (1) anfiel. Die Folgeprodukte (1. und (2) wurden von der Platte separiert und getrennt mit Äther eluiert. Das Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte jeweils

einen fast weißen Rückstand, der zu der entsprechenden Meßlösung, für die Spektrumaufnahme zwischen 300 und 200 nm, zubereitet wurde. Für das Fotoprodukt (1) wurde eine Absorptionskurve mit einem Maximum bei der Wellenlänge 220 nm erhalten. Für das Fotoprodukt (2) konnte kein sauberes Spektrum erzielt werden.

7. Die präparative Darstellung der Fotoprodukte

=====

Die Neigung des Diacetyllactucins während der Fotoreaktion nicht nur die gewünschten Fotoprodukte (1) und (2), sondern weitergehend sehr schnell Sekundärprodukte zu bilden, erschwert die präparative Darstellung der Folgeprodukte erheblich. So entfällt die Möglichkeit einen lohnend großen Ansatz einer entsprechend langen Bestrahlungsdauer zu unterziehen. Da die Fotoreaktion ausschließlich an der Lösungsmitteloberfläche verläuft, wird dann der Artefaktbildung Vorschub geleistet, wenn aufgrund einer zu hoch gewählten Konzentration an Diacetyllactucin eine entsprechend lange Bestrahlungszeit gewählt werden muß. Eine Trennung und Isolierung der Fotoprodukte (1) und (2) wird somit außerordentlich erschwert oder gar unmöglich gemacht.

7.1. Die Versuchsbedingungen

In Vorversuchen wurde die Grenzkonzentration an Diacetyllactucin gefunden, die eine maximale Ausbeute an Fotoprodukten lieferte. Sehr gut geeignet waren Bestrahlungslösungen von 20 mg des Guaianolides in 100 ml Lösungsmittel, die eine optimale Reaktionszeit von 7 bis 8 Minuten erforderten. Bestrahlungslösungen der Konzentration 50 mg/100 ml benötigten eine Reaktionszeit von 16 bis 20 Minuten und erwiesen sich als maximal möglicher Ansatz.

Das Reaktionsende mußte für jeden Ansatz durch spektralfotometrische Verfolgung der Guaianolidzerstörung bestimmt werden. Zeitdifferenzen von $\pm 20\%$ waren bei Ansätzen gleicher Konzentration zu beobachten.

7.2. Durchführung der Fotoreaktion

Zur Darstellung der Fotoprodukte wurden 15 Ansätze mit jeweils 50 mg Diacetyllactucin in 100 ml 95%igem Methanol einer UV-Bestrahlung ausgesetzt. Jeder Ansatz wurde nach dem Reaktionsende im Vakuum zur Trockenen eingeeengt und unter Lichtausschluß im Vakuumexsikkator aufbewahrt. Erst nach Beendigung der Versuchsreihe wurden die Rückstände vereinigt. Aus 750 mg eingesetztem Diacetyllactucin konnte ich 632 mg Fotoprodukte als weißen, amorphen Rückstand gewinnen.

Die DC-Untersuchung des Rückstandes zeigte, daß die Fotoprodukte (1) und (2) vorlagen, und zwar das Produkt (1) in überwiegender Konzentration.

7.3. Die Trennung der Fotoprodukte (1) und (2)

Die Trennung der Fotoprodukte erwies sich als schwierig. Ihr schlechtes Kristallisationsvermögen ließ die Trennung durch ein echtes, fraktioniertes Auskristallisieren nicht zu. Als ebenfalls ungeeignete Methoden erwiesen sich die präparative DC und die Säulenchromatographie. Eine Trennung wurde letztlich durch eine Fällungsmethode erreicht, die das Fotoprodukt (1) in reiner Form lieferte.

Das Gemisch der beiden Fotoprodukte wurde in der Wärme in Chloroform gelöst und bis zum Auftreten einer Trübung mit Petroläther versetzt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur und längerem Stehen bei -25°C bildete sich ein reinweißer, kristallin-amorpher Niederschlag. Der gesammelte Niederschlag wurde mehrfach dieser Fällungsmethode unterzogen, bis letztlich 127,5 mg reines Fotoprodukt (1) vorlagen. Damit war die Darstellung eines Fotoproduktes des Diacetyllactucins gelungen.

Aus den anfallenden Mutterlaugen konnte das Fotoprodukt (2) nicht mehr isoliert werden.

7.4. Beiträge zur Charakterisierung des Fotoproduktes (1)

7.4.1. Das isolierte Fotoprodukt (1) war dünnschichtchroma-

tographisch rein und zeigte einen Rf-Wert von 0.38 (vgl. Abb. 19).

7.4.2. Der Schmelzpunkt der isolierten Verbindung lag bei $102 - 104^{\circ}\text{C}$.

7.4.3. Zur Aufnahme des UV-Spektrums des Fotoproduktes (1) wurde die Substanz in 95%igem Äthanol gelöst. Die Messung erfolgte mit einer Meßlösung der Konzentration von $10\gamma/\text{ml}$ bei der Wellenlänge von 300 bis 200 nm. Das aufgenommene Spektrum ist zum Vergleich mit dem Diacetyllactucin-Spektrum in der Abb. 23 wiedergegeben.

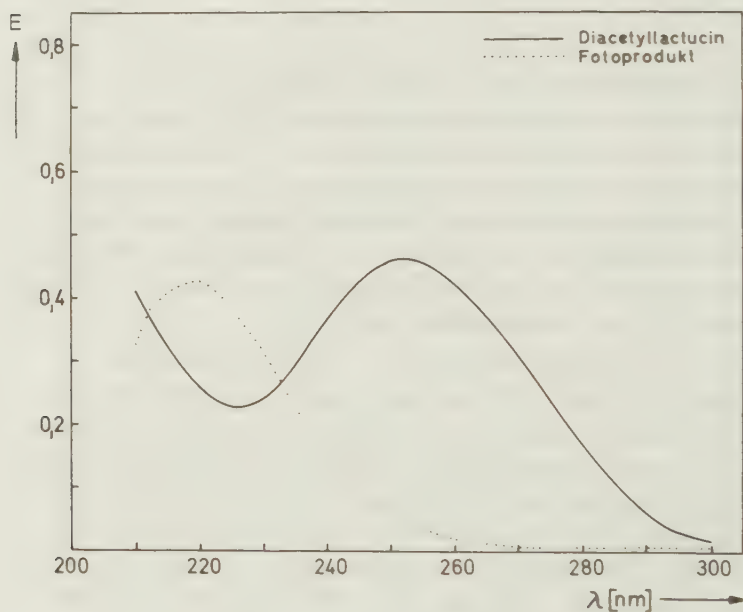


Abb.23: Vergleich des UV-Spektrums Diacetyllactucin zum Fotoprodukt (1)

Wiederum war die schon bekannte hypsochrome Verschiebung des ursprünglichen Guaianolid-Spektrums zu beobachten, die hier beim Diacetyllactucin 32,5 nm betrug. Die neue

Maximumslage wurde bei der Wellenlänge von 220 nm festgehalten. Das Diacetyllactucin-Maximum bei 252,5 nm wurde nicht mehr beobachtet.

7.4.4. Das IR-Spektrum des Fotoproduktes (1) wurde in KBr aufgenommen und ist in der Abb. 24 wiedergegeben.

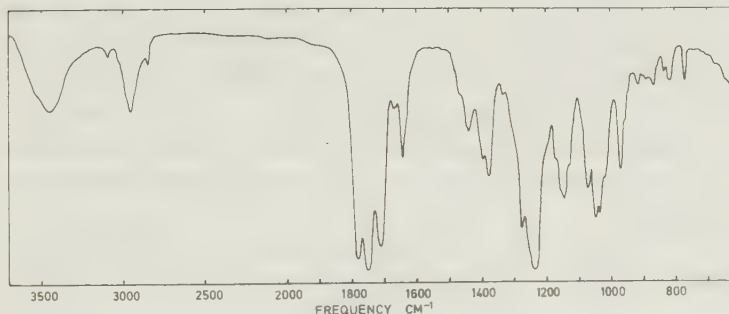


Abb.24: IR-Spektrum des Diacetyllactucin-Fotoprodukt (1)

Das IR-Spektrum weist folgende Banden auf (cm^{-1}):

1780 (γ -Lacton), 1755 (Acetatgruppe), 1710 (zweifach α,β -ungesättigte Ketogruppe im Fünfring). Im Vergleich zum Diacetyllactucin-Spektrum ist die fehlende Bande bei 1630 (für eine C=C-Doppelbindung) als auffälligstes Merkmal zu verzeichnen. Die erhaltengebliebenen Banden für die Carbonylgruppe und das γ -Lacton zeigen an, daß das Guaianolidgrundgerüst erhalten geblieben ist.

8. Der Einfluß des Lösungsmittels auf die Fotoreaktion

=====

8.1. Entwicklung einer Arbeitshypothese

Schenck, Huke, Naumann (29) konnten aus einer bestrahlten wässrigen Lactucinlösung ein Isomerisierungsprodukt und ein Wasseraddukt als Foto-Folgeprodukte isolieren. Zur Fotoreaktion einer α,β ungesättigten Ketogruppe sind u.a.

folgende Veröffentlichungen erschienen: (62) (63) (64) (65). Pfau et al. und Williams und Mitarbeiter geben an, daß die Bestrahlung dieser Ketone in primären und sekundären Alkoholen in einer Radikalreaktion Alkoholaddukte liefert. Ciamician et al. (66) und Grewe und Mitarbeiter (67) beschreiben die Entkopplung von Doppelbindungen in cyclischen Verbindungen. Die Arbeitskreise um Stoermer (68) und Wang (69) geben Ausführungen über fotochemisch gebildete Wasseraddukte.

Nach der Auswertung der Naumannschen Ergebnisse und der Literaturzitate wäre die Aufstellung folgender Arbeitshypothese möglich:

Wird die Fotoreaktion mit einem in 95%igem Methanol gelösten Guaianolid durchgeführt, ist die Bildung von drei Fotoprodukten denkbar:

- a) ein Isomerisierungsprodukt
- b) ein Alkoholaddukt
- c) ein Wasseraddukt.

Bei der Durchführung der Reaktion konnte ich jedoch nur zwei Fotoprodukte beobachten. Ein Fotoprodukt, wahrscheinlich ein Alkoholaddukt, konnte ich isolieren. In den folgenden Untersuchungen sollen Beiträge über den Einfluß unterschiedlicher Lösungsmittel bei einer Fotoreaktion erarbeitet werden.

62) N.C. Yang, M.J. Jorgenson Tetrahedron Letters (London) 19, 1203, 1964

63) P.J. Kropp Tetrahedron Letters (London) 48, 3647, 1964

64) M. Pfau, R. Dulou, M. Vilkas Comp. Rend. 254, 1817, 1962

65) A. Williams, P. Bladon Tetrahedron Letters (London) 1964, 257

Die Literatur (64) (65) ist zitiert in der Arbeit von T. Matsuura, K. Ogura über "the photochemical reaktion of Pummerer's Ketone" in J. Amer. chem. Soc. 88, 2602, 1966

66) G. Ciamician, P. Silber Ber. dtsch. chem. Ges. 41, 1928, 1908

67) R. Grewe, W. Wulf Chem. Ber. 84, 621, 1951

68) R. Stoermer, H. Stockmann Ber. dtsch. chem. Ges. 47, 1786, 1914

69) S.Y. Wang, M. Apicella, B.R. Stone J. Amer. chem. Soc. 78, 4180, 1956

8.2. Durchführung der Versuche

5 mg Diacetyllactucin wurden jeweils in 100 ml der verschiedenen Lösungsmittel gelöst und ergaben die Bestrahlungslösungen. Sie wurden für bestimmte Zeit der Lichteinwirkung ausgesetzt. Der Ablauf der Fotoreaktion wurde spektralfotometrisch verfolgt. Die Reaktion wurde immer dann abgebrochen, wenn die gemessene Extinktion des Diacetyllactucin-Maximums auf 10% ihres ursprünglichen Wertes gesunken war. Nach Beendigung der Fotoreaktion wurde der Ansatz vom Lösungsmittel befreit. Jeweils gleiche Konzentrationen von Lösungen der Reaktionsrückstände wurden durch die DC kontrolliert. Die Ergebnisse der DC sind in der Abb. 25 wiedergegeben. Als Lösungsmittel

Adsorbens:	Kieselgel HF ₂₅₄	* Diac.-Lc.
Laufmittel:	Butylazetat/Äthylazetat	= Diacetyllactucin
Laufstrecke:	12 cm	85:15 (V/V)
Detektion:	Folin-Ciocalteu-Reag.	
Konzentration:	30 γ	

Diac.-Lc. *	i. 95% MeOH	i. 100%	i. 95% AeOH	i. 100%	isoliertes
unbestrahlt	5'	35'	15'	15'	Fotoprod.

Abb. 25: DC der Reaktionsrückstände aus verschiedenen Bestrahlungsmedien

wurde 95%iger und 100%iger Methanol und Äthanol als Reaktionsmedium eingesetzt. Die spektralfotometrische Verfolgung der Guaianolidzerstörung ist in den Abb. 26, 27, 28, 29 dargestellt.

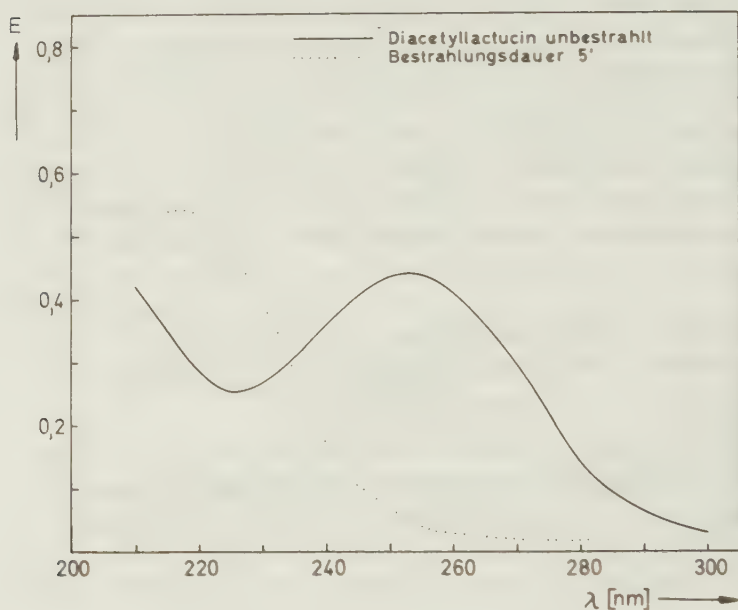


Abb.26: Fotoreaktion von Diacetyllactucin in 95%igem Methanol

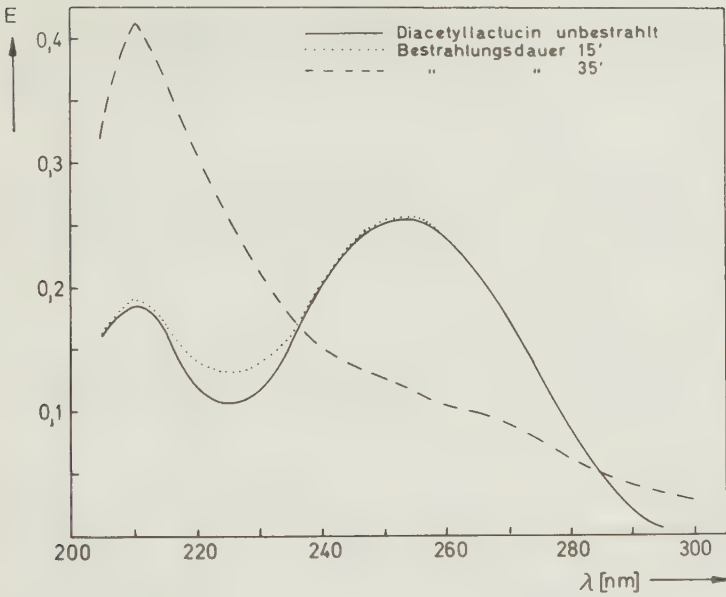


Abb.27: Fotoreaktion von Diacetyllactucin in 100%igem Methanol

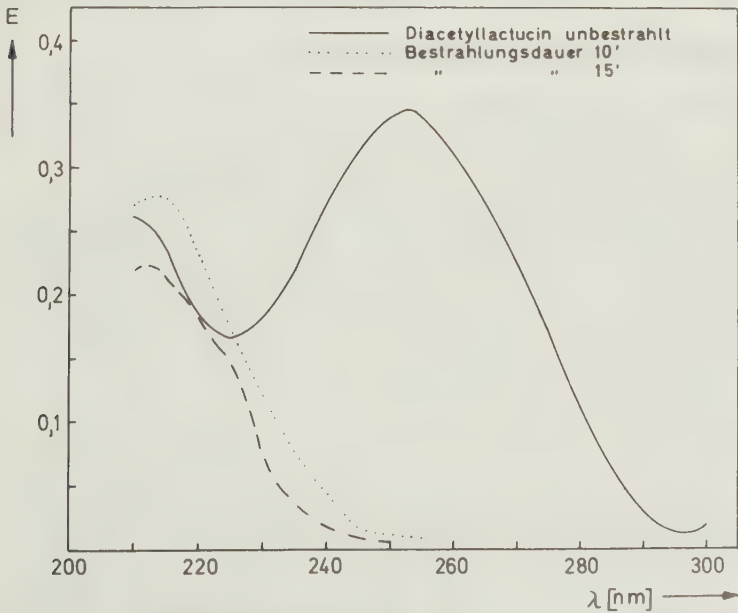


Abb.28: Fotoreaktion von Diacetyllactucin in 95%igem Äthanol

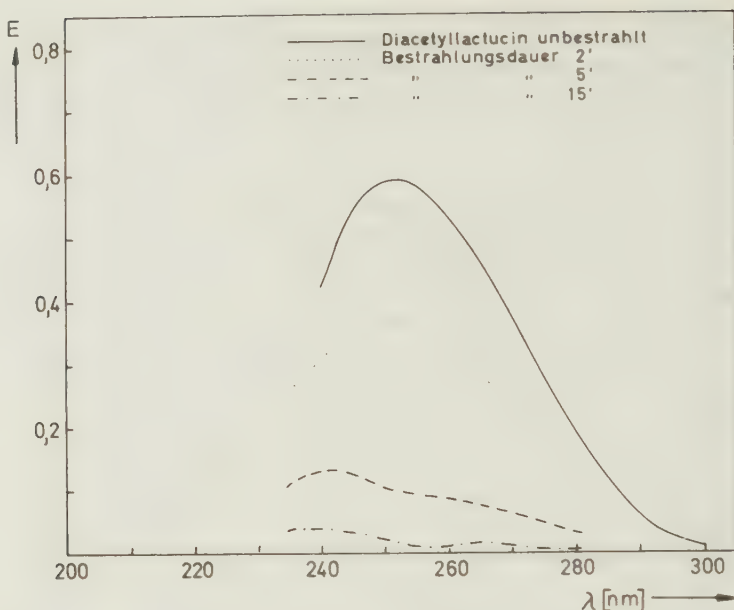


Abb.29: Fotoreaktion von Diacetyllactucin in 100%igem Äthanol

8.3. Auswertung der Versuchsergebnisse:

a) Bestrahlung in Methanol:

Diente 95%iger Methanol als Lösungsmittel, war nach 5 Minuten eine praktisch quantitative Diacetyllactucin-Zerstörung zu verzeichnen. Die neugebildete Absorptionskurve wies ein Maximum bei 218 nm auf. Im DC wurden zwei Fotoprodukte beobachtet. War 100%iger Methanol das Bestrahlungsmedium, so war die Fotoreaktion erst nach 35 Minuten abgeschlossen. Im DC war die Ausbildung eines Fotoproduktes zu verzeichnen.

b) Bestrahlung in Äthanol:

Die Bestrahlung des Diacetyllactucins in 95%igem Äthanol erbrachte nach 15 Minuten seine Zerstörung. In der Absorptionskurve trat die Andeutung, aber nicht die klare Ausbildung eines Maximums bei 215 nm auf. Im DC konnte die Identität des Fleckes nicht bestimmt werden. Diente

100%iger Äthanol als Lösungsmittel, war die Guaianolidzerstörung nach 15 Minuten abgeschlossen. Eine neue Absorptionskurve wurde nicht ausgebildet. Im DC war die Identität des Fleckes nicht zu bestimmen.

Eine klärende Diskussion ist nicht möglich. Eindeutig und zweifelsfrei ist jedoch der Einfluß unterschiedlicher Lösungsmittel auf den Ablauf der Fotoreaktion festzustellen.

9. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Untersuchungen am Diacetyllactucin

=====

9.1. Diacetyllactucin wurde als eine lichtlabile Substanz erkannt. Seine Instabilität, das heißt seine fotochemische Zerstörung wurde in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Fotoreaktion aufgezeigt. Im Vergleich zum Lactucin neigte die Diacetylverbindung während einer Fotoreaktion stark zur Ausbildung von Sekundärprodukten, was die Isolierung der Fotoprodukte erheblich erschwerte.

9.2. Bei der Bestrahlung des Diacetyllactucins in 95%igem Methanol wurden zwei Fotoprodukte beobachtet, von denen das Fotoprodukt (1) als Reinsubstanz isoliert wurde.

9.3. Zur Charakterisierung des Fotoproduktes (1) wurden Beiträge erarbeitet. Seine charakterisierenden Daten (wie Schmp., UV- und IR-Spektren, Rf-Wert) konnte ich festhalten und diskutieren.

9.4. Der Einfluß unterschiedlicher Lösungsmittel im Ablauf der Fotoreaktion war deutlich vorhanden, Gesetzmäßigkeiten aber nicht zu erkennen.

V. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS LEUKODIN

1. Das Vorkommen und die Charakteristika des Leukodins

Das Guaianolid Leukodin (IX) - $C_{15}H_{18}O_3$ - wurde durch Holub und Herout (70) und durch Rybalko (71) aus dem Äthanolextrakt der Artemisia Leukodes Schrenk isoliert und in seiner Struktur als Desacetoxy-Matricarin erkannt. Rybalko nannte diese Verbindung Leukomisin.

In der Abb. 30 werden die von beiden Arbeitsgruppen veröffentlichten charakterisierenden Daten wiedergegeben.

	(70)	(71)
Bruttoformel	$C_{15}H_{18}O_3$	$C_{15}H_{18}O_3$
Schmp. °C	202 - 203	196 - 198
$[\alpha]_D^{20}$	+ 58°	+ 55,9°
IR-Spektrum ν (cm ⁻¹)	1788, 1640, 1623 1688	1779, 1687, 1642, 1619
UV-Spektrum λ_{max} (nm) log. ϵ		256 4.12

Abb.30: Charakteristika des Leukodins (70) (71)

Aus der in Ägypten wildwachsenden Achillea santolina L. konnte ein ägyptisches Arbeitsteam (72) (73) dasselbe Sesquiterpenlacton isolieren. Sie benannten die Verbindung Santolin.

Für das Leukodin ergeben sich die synonymen Bezeichnungen: Desacetoxy-matricarin = Leukomisin = Santolin.

Mit dem Achillin, isoliert aus Extrakten der Achillea lanulosa (74), existiert ein weiteres Sesquiterpenlacton

- 70) M. Holub, V. Herout, Collect. czechoslov. chem. Commun. 27, 2980, 1962
 71) K.S. Rybalko, J. Gen. Chem. 33, 2734, 1963
 72) D.Y. Haddad, S.M. Khafagy, L. Fataty, J. pharmac. Sci. United Arab. Rep. 1, 75, 1960
 73) S.M. Khafagy, L. Fataty, M.S. Amer, Acta pharmac. suecica 2, 403, 1965
 74) E.H. White, E.K. Winter, Tetrahedron Letters [London] No 3 137, 1963

der Summenformel $C_{15}H_{18}O_3$, das mit seinen Derivaten eine Serie stereoisomerer Verbindungen mit dem Matricarin bzw. dem Leukodin bildet.

Aus der *Artemisia tridentata* Nutt ssp. *tridentata* isolierten dann Geissman und Mitarbeiter (75) ein Guaianolid, welches sie ebenfalls als Desacetoxy-matricarin identifizierten.

Beiträge zur Stereochemie veröffentlichten Linde und Ragab (76) 1967. Sie vollzogen ihre Untersuchungen am isolierten Santolin, das sie durch Nacharbeit der Vorschrift von Haddad et al. (72) darstellten. Ebenfalls zur Stereochemie des Leukodins und Achillins äußerten sich 1967 White und Marx (77). Sie synthetisierten Leukodin ausgehend vom O-Acetylisofotosantoninlacton.

Für meine Untersuchungen stand mir 1,0 g Leukodin nach (70) zur Verfügung.

Nach der Feststellung der charakterisierenden Daten (Schmp. $202^{\circ}C$; λ max. 255 nm, $\log. \epsilon$ 4.16; ν cm^{-1} : 1785, 1690, 1645, 1625) und dem Vergleich mit den Literaturwerten (vgl. Abb. 30) war die Reinheit und Identität des Leukodins als gesichert zu betrachten.

2. Die Löslichkeit des Leukodins

=====

Leukodin ist löslich in: Chloroform, Azeton, Äthanol, Methanol und in heißen Laugen. Nicht lösen läßt sich die Verbindung in: Cyclohexan, Petroläther, Wasser und kalten Laugen. Somit wird wiederum Methanol das Bestrahlungsmedium bilden.

3. DC von Leukodin

=====

Die DC von Leukodin kann an den Adsorptionsmitteln Kieselgel GF und HF 254 und in den Fließmitteln Äther/Benzol 80:20

75) T.A. Geissman, Th. Stewart, M.A. Irwin, *Phytochemistry* 6, 901, 1967

76) H.H.A. Linde, M.S. Ragab, *Helv. chim. acta* 50, 1961, 1967

77) E.H. White, J.N. Marx, *J. Amer. chem. Soc.* 89, 5511, 1967

(V/V) oder Butylazetat/Äthylazetat 85:15 (V/V) durchgeführt werden. Als Detektionsmittel bietet sich UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (nachweisbare Leukodinkonzentration 10 γ) und das Phenolreagens nach Folin-Ciocalteu (nachweisbare Leukodinkonzentration 20 - 30 γ) an.

Für die folgenden Untersuchungen wurde Kieselgel HF 254 als Adsorbens und Butylazetat/Äthylazetat als Laufmittel gewählt. Bei einer Laufstrecke von 12 cm zeigte Leukodin den Rf-Wert von 0.475.

4. Feststellung der Lichtempfindlichkeit des Leukodins =====

Es ist zu erwarten, daß das Leukodin aufgrund seiner, dem Lactucin analogen Struktur mit der α, β ungesättigten Keto-gruppe im Molekül, ebenfalls eine lichtlabile Substanz ist. Zur Feststellung der Lichtempfindlichkeit wurde seine Bestrahlung auf der DC-Platte durchgeführt. Es wurden einzelne Startpunkte mit der Leukodinkonzentration von 20 γ einer unterschiedlich langen Bestrahlungsdauer ausgesetzt. Der Bestrahlungszeitraum reichte von 0 bis 20 Minuten. Die Ergebnisse sind in der Abb. 31 wiedergegeben.

Ergebnisse der Versuchsreihe

Leukodin ist eine lichtempfindliche Substanz und wird durch Bestrahlung zerstört. Nach einer Bestrahlungsdauer von drei Minuten war erstmalig ein neuer Fleck (1) mit dem Rf-Wert von 0.3 im Chromatogramm zu beobachten. Nach zehn Minuten war ein weiterer Fleck (2) eines zweiten Fotoproduktes zu verzeichnen (Rf-Wert 0.35).

Die Bestrahlungszeit wurde auf 20 Minuten ausgedehnt, erbrachte aber keine wesentliche Änderung mehr im Chromatogramm.

Adsorbens:	Kieselgel HF ₂₅₄	L=Leukodin
Laufmittel:	Butylazetat / Äthylazetat	Rf= 0,47
Laufstrecke:	12 cm 85:15 (V/V)	1= Fotoprodukt
Detektion:	Folin-Ciocalteu-Reag.	Rf= 0,3
Konzentration:	20 g	2= Fotoprodukt
		Rf= 0,35

Bestrahlungszeit [min] →						
0	1	3	5	10	15	20
○L	○L	○L	○L	○L	○L	○
		○1	○1	○2 ○1	○2 ○1	○ ○

Abb.31: Leukodinzerstörung auf der DC-Platte

5. Spektralfotometrische Verfolgung der Leukodinzerstörung durch Lichteinfluß

=====

Eine 0,05%ige methanolische Leukodinlösung wurde einer Bestrahlung unterzogen. In bestimmten Abständen wurden der Reaktionslösung nach dem Auffüllen des verdunsteten Lösungsmittelanteils Proben entnommen, die mit 95%igem Methanol zur Meßlösung (10γ/ ml) verdünnt wurden. Zur Verfolgung der Leukodinzerstörung wurde das Spektrum der betreffenden Meßlösung zwischen 300 und 200 nm aufgenommen. Der Verlauf der Fotoreaktion ist in der Abb. 32 wiedergegeben.

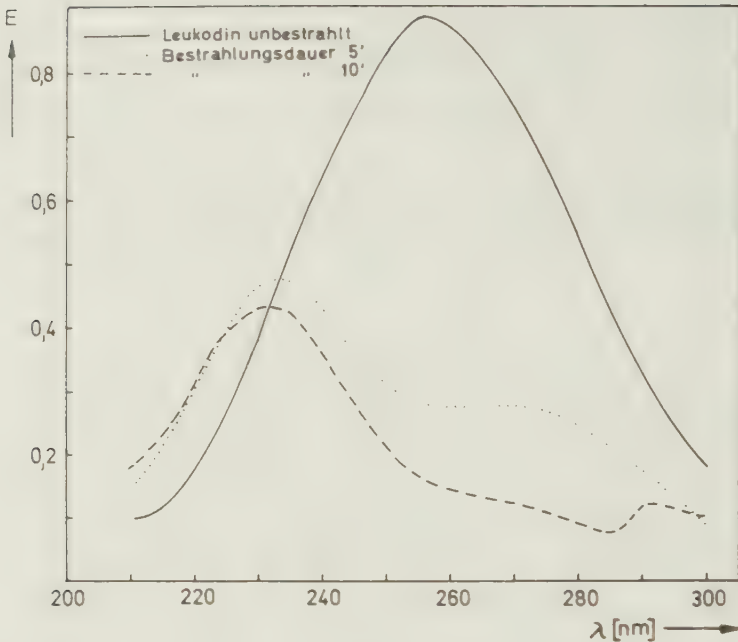


Abb. 32: Spektralfotometrische Verfolgung der Leukodinerstörung

Diskussion der Ergebnisse

Eine charakteristische Kurvenschar wurde im Verlauf der Fotoreaktion erhalten. Deutlich ist zu erkennen, wie das ursprüngliche Leukodin-Maximum bei der Wellenlänge von 256 nm in seiner Intensität abnimmt. Es kommt zu einer hypsochromen Maximumverschiebung um 23 nm, das heißt, eine neue Absorptionskurve mit der Maximumlage bei 233 nm ist zu verzeichnen.

6. Der Einfluß der Lösungsmittel bei der Fotoreaktion des Leukodins

=====

6.1. Spektralfotometrische Verfolgung der Fotoreaktion

In den Versuchen IV.8.2. (vgl. S. 55) wurde der Lösungsmit-

teleinfluß auf den Ablauf der Fotoreaktion am Diacetyllactucin festgehalten. Entsprechende Versuche wurden mit dem Leukodin durchgeführt.

Ich löste etwa gleiche Leukodinnmengen jeweils in 95%igem und 100%igem Methanol und Äthanol und setzte diese Lösungen einer Lichteinwirkung aus. Der Reaktionsverlauf wurde wie üblich spektralfotometrisch verfolgt und ist für die verschiedenen Lösungsmittel in den Abb. 33, 34 und 35 wiedergegeben.

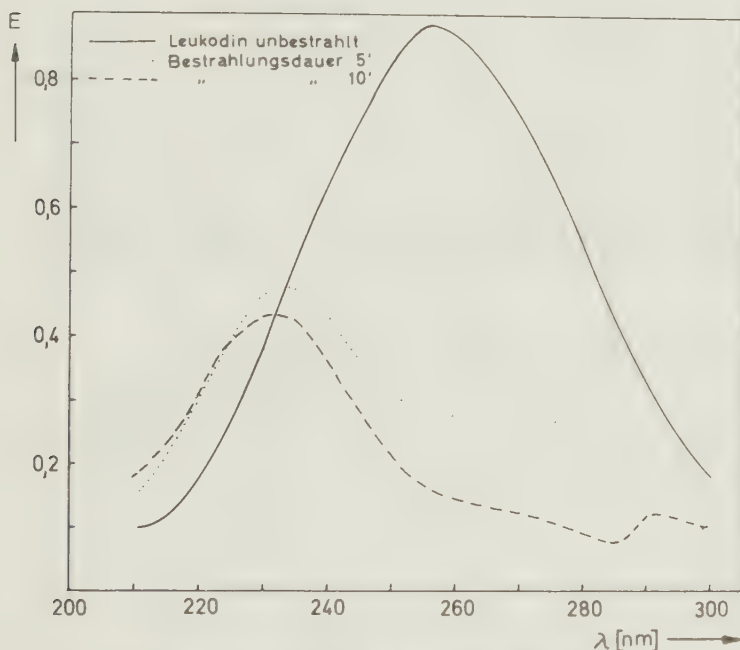


Abb.33: Leukodinzerstörung in 95%igem Methanol

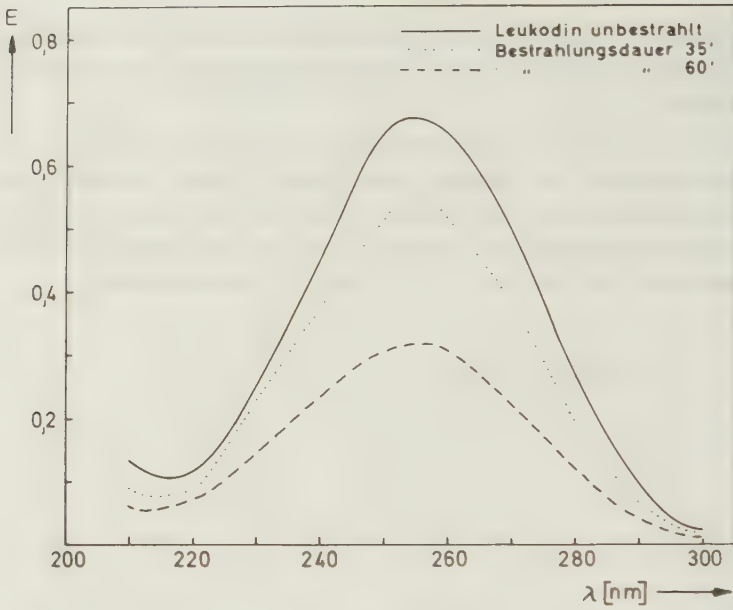


Abb.34: Leukodinzerstörung in 100%igem Methanol

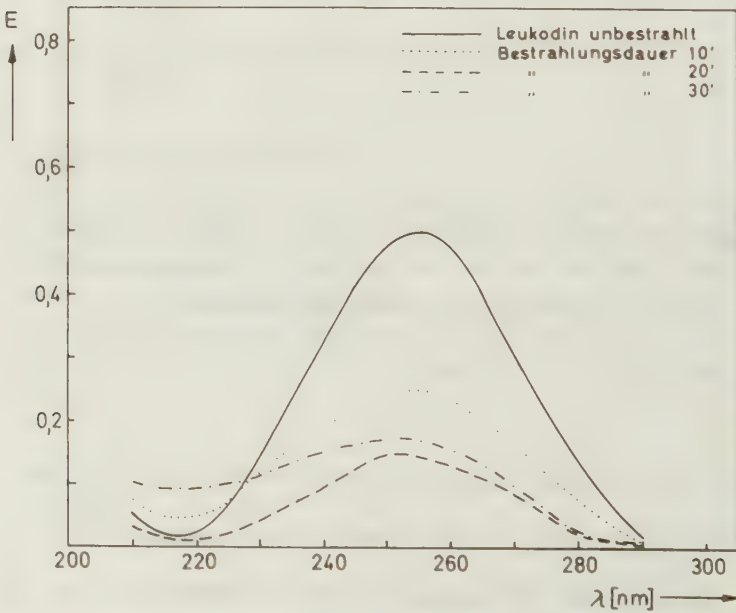


Abb.35: Leukodinzerstörung in 95%igem Äthanol

6.2. Verfolgung der Leukodinerstörung durch die DC

Nach Beendigung der Fotoreaktion wurde der betreffende Ansatz vom Lösungsmittel befreit. Die Reaktionsrückstände wurden zu definierten Lösungen gelöst, von denen jeweils gleiche Konzentrationen zur dünnschichtchromatographischen Arbeit eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der DC-Untersuchung sind in der Abb. 36 wiedergegeben.

Adsorbens: Kieselgel HF ₂₅₄ Laufmittel: Butylazetat/Äthylazetat 85:15 (V/V) Laufstrecke: 12cm Detektion: Folin-Ciocalteu-Reag. Konzentration: 30 μ g					1 = Leukodin 2 } = Fotoprodukte 3 } 4 } = Sekundärprod. 5 }
Leukodin unbestrahlt	Leukodin bestrahlt in:				
	95% MeOH	100% MeOH	95% AeOH	100% AeOH	
①	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤	

Abb. 36: DC-Verfolgung der Leukodinerstörung bei der Anwendung unterschiedlicher Lösungsmittel als Reaktionsmilieu

6.3. Diskussion der Ergebnisse

Die aufgefundenen Ergebnisse dieser Versuchsreihe entsprechen in guter Näherung den Aussagen der Untersuchungen am Diacetylactucin (vgl. S. 58), ohne daß beide Versuchsreihen eine eindeutige, klärende Diskussion zulassen.

Eine fotochemische Leukodinzerstörung war nur in 95%igen methanolischen Lösungen unter der Ausbildung von Folgeprodukten zu verzeichnen. Wurde die Fotoreaktion spektralfotometrisch verfolgt (Abb. 32), kam es zur Ausbildung einer Absorptionskurve mit einem Maximum bei 233 nm. Im DC wurden zwei Fotoprodukte beobachtet.

Diente 100%iger Methanol als Reaktionsmilieu, so war die Fotoreaktion erst nach einer erheblich größeren Zeitspanne abgeschlossen. Wie die Abb. 34 zeigt, war spektralfotometrisch eine Intensitätsabnahme für das Leukodin zu verzeichnen. Eine neue Absorptionskurve mit einem Maximum wurde jedoch nicht beobachtet. Die DC-Untersuchung (Abb. 36) zeigte in schwacher Intensität die Ausbildung eines Fotoproduktes.

Wurden andere alkoholische Lösungen als Reaktionsmedien gewählt, so war spektralfotometrisch nur der Verlust an Leukodin an der fallenden Intensität seines Absorptionsmaximums abzulesen. Ein während der Fotoreaktion gebildetes Folgeprodukt war durch das Auftreten einer neuen Absorptionskurve nicht zu erkennen. Im DC wurden bei der Anwendung von 95%igem und 100%igem Äthanol zwar jeweils ein Fotoprodukt beobachtet, seine Zuordnung war jedoch nicht eindeutig möglich.

7. Präparative Darstellung eines Leukodin-Fotoproduktes =====

Zur Isolierung des Fotoproduktes wurden 10 Ansätze von 50 ml einer 0,1%igen, methanolischen (95% MeOH) Leukodinlösung bestrahlt. Der Reaktionsverlauf wurde spektralfotometrisch verfolgt. Nach einer mittleren Bestrahlungszeit von 15 Minuten war für einen Ansatz die Reaktion beendet.

Die bestrahlten Lösungen wurden vereinigt und im Vakuum vom

Lösungsmittel befreit. Es verblieb ein durchsichtiger, viskoser Ölfilm als Rückstand, der nach längerem Stehen bei -3°C zu einer weißen, amorphen Masse erstarrte. Von diesem Rückstand wurde ein DC angefertigt, das in der Abb. 37 wiedergegeben ist.

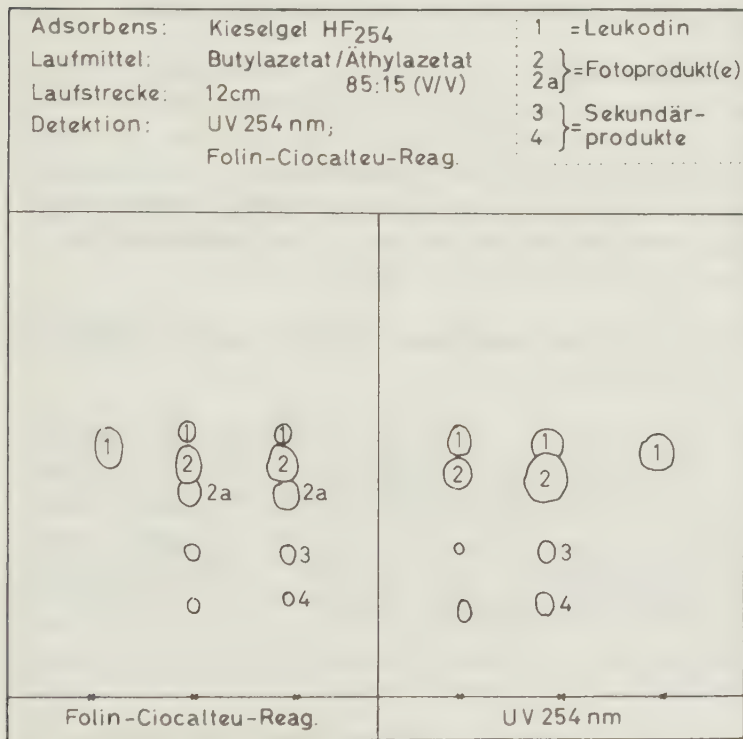


Abb.37: DC des Leukodin-Fotoreaktionsrückstandes

7.1. Die Trennung der Fotoprodukte

Zur Reinigung des Bestrahlungsrückstandes wurde dieser nach der Behandlung mit einer sehr kleinen Menge Aktivkohle aus Benzol/Petroläther umkristallisiert. Nach längerem Stehen des filtrierten Kristallisationsansatzes bei -3°C bildeten sich lange, zum Teil farnartige Kristalle, die, nach dem Abheben der Mutterlauge mittels einer Ballonkapillare, ge-

sammelt wurden. Nach 6stündigem Trocknen im Vakuum bei 20°C erhielt ich schneeweiße Kristalle in der Ausbeute von 94,34 mg.

Aus den Mutterlaugen konnte keine weitere Verbindung isoliert werden.

7.2. Charakterisierung des isolierten Fotoproduktes

7.2.1. Im DC mit Kieselgel HF 254 als Adsorbens und Butylazetat/Äthylazetat 85:15 (V/V) als Laufmittel zeigte sich für das Fotoprodukt nur ein Fleck, der sich deutlich von einer Vergleichsprobe Leukodin unterscheiden ließ. Bei einer Laufstrecke von 12 cm zeigte das Leukodin einen Rf-Wert von 0,475 und sein Fotoprodukt von 0,30. Das Fotoprodukt war identisch mit dem Fleck (2) in der DC-Abb. 37.

7.2.2. Das isolierte Fotoprodukt zeigte einen scharfen Schmelzpunkt von 111°C.

7.2.3. Das UV-Spektrum der Substanz wurde zwischen 300 und 200 nm in 95%igem Methanol aufgenommen. Es wurde eine Absorptionskurve mit einem Maximum bei 233 nm aufgezeichnet. Die Abb. 38 gibt das UV-Spektrum des Fotoproduktes im Vergleich zu unbestrahltem Leukodin wieder und zeigt deutlich die aufgetretene Bandenverschiebung.

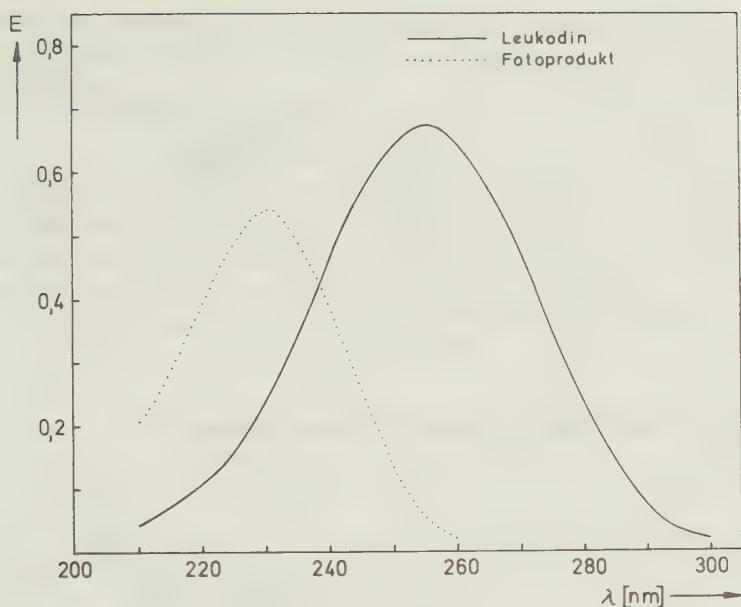


Abb.38: Vergleich der UV-Spektren von Leukodin und seinem Fotoprodukt; aufgenommen in 95%igem MeOH

7.2.4. Das IR-Spektrum (Abb. 39) des Fotoproduktes zeigt gegenüber dem Leukodinspektrum (Abb. 40) seine deutlichste Veränderung bei 1625 cm^{-1} durch das Fehlen einer C=C-Bande. Die Banden der Carbonylgruppe bei 1705 cm^{-1} und die des γ -Lactons bei 1780 cm^{-1} zeigen, daß das Guaianolidmolekül intakt geblieben ist.

7.2.5. Das Molekulargewicht des isolierten Fotoproduktes - bestimmt durch ein Massenspektrum - beträgt 278. Das Molekulargewicht des Leukodins ist mit 246,3 gegeben.

7.2.6. Das Molekulargewicht der Substanz und die Ergebnisse ihrer C,H-Elementaranalyse ermöglichten die Aufstellung der Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_4$. Sie bestätigte, daß das isolierte Fotoprodukt ein Methanoladdukt darstellt.

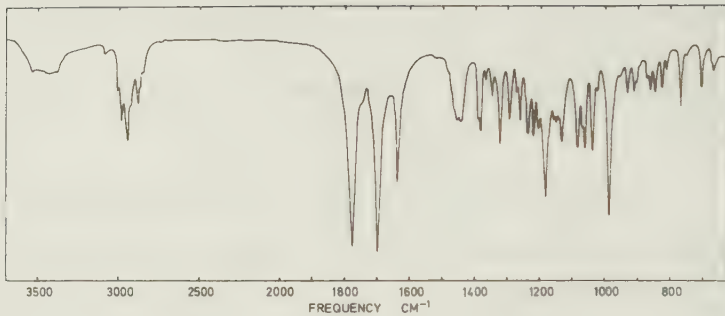


Abb.39: IR-Spektrum des Leukodin-Fotoproduktes (KBr)

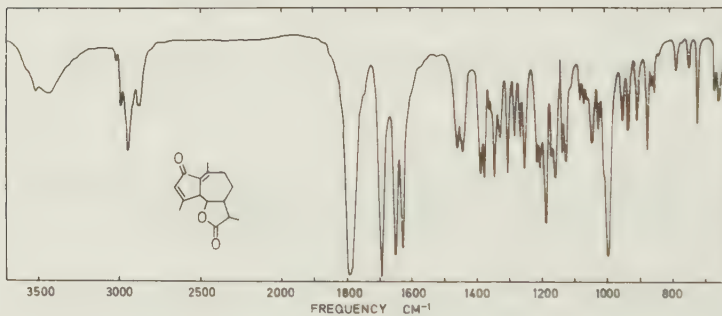


Abb.40: IR-Spektrum des Leukodins (KBr)

8. Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse über das Leukodin

=====

8.1. Leukodin ist wie Matricarin, Lactucin und Diacetyl-lactucin eine lichtlabile Substanz. Nach der Bestrahlung einer methanolischen Leukodinlösung konnte ich ein fotochemisches Folgeprodukt isolieren.

Durch die im Massenspektrum gefundenen Unterschiede der Molekulargewichte für das Leukodin und für das isolierte Fotoprodukt kann als sicher angenommen werden, daß das Foto-produkt als ein Methanoladdukt vorliegt.

8.2. Für das isolierte Fotoprodukt des Leukodins erarbeitete ich die charakterisierenden Daten (Schmp., UV- und IR-Spektren, Rf-Wert).

8.3. Ich untersuchte den Einfluß von unterschiedlichen Lösungsmitteln auf die Fotoreaktion und konnte zeigen, daß nur in 95%igen methanolischen Lösungen die Bildung eines Fotoproduktes erfolgte. In diesem Bestrahlungsmedium war der Ablauf der Fotoreaktion spektralfotometrisch zu verfolgen.

VI. VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LICHTEMPFLINDLICHKEIT DER GUAIANOLIDE MATRICARIN, LACTUCIN, DIACETYL-LACTUCIN UND LEUKODIN

In den einzelnen Untersuchungen über die Stabilität der genannten Guaianolide konnte ich zeigen, daß diese Sesquiterpene außerordentlich empfindlich gegen Lichteinwirkungen reagierten. Hierbei kam es zur Ausbildung von fotochemischen Folgeprodukten.

Ich bemerkte weiterhin, daß ein Einfluß unterschiedlicher Lösungsmittel auf den Reaktionsverlauf zu verzeichnen war. Diese Tatsache wurde diskutiert, erbrachte aber keine Gesetzmäßigkeit. Darüber hinaus deuteten die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche darauf hin, daß auch die einzelnen Guaianolide trotz der gleichen chromophoren Gruppe unterschiedlich schnell reagierten. Zur Feststellung, ob unterschiedlich schnelle Reaktionen bei den einzelnen Guaianoliden auftreten, werde ich in einer vergleichenden Versuchsreihe etwa gleiche Konzentrationen der einzelnen Guaianolide in methanolischer Lösung der Fotoreaktion aussetzen.

Zur Durchführung des Vergleiches wurden adäquate Mengen eines jeden Guaianolides in 95%igem Methanol gelöst und bestrahlt. Die Fotoreaktion wurde spektralfotometrisch verfolgt und abgebrochen, wenn mindestens 90% des eingesetzten Guaianolides zerstört waren. Die Versuchsbedingungen wurden während der gesamten Untersuchungsreihe konstant gehalten.

Die Auswertung der Meßreihe wurde graphisch in der Abb. 41 dargestellt.

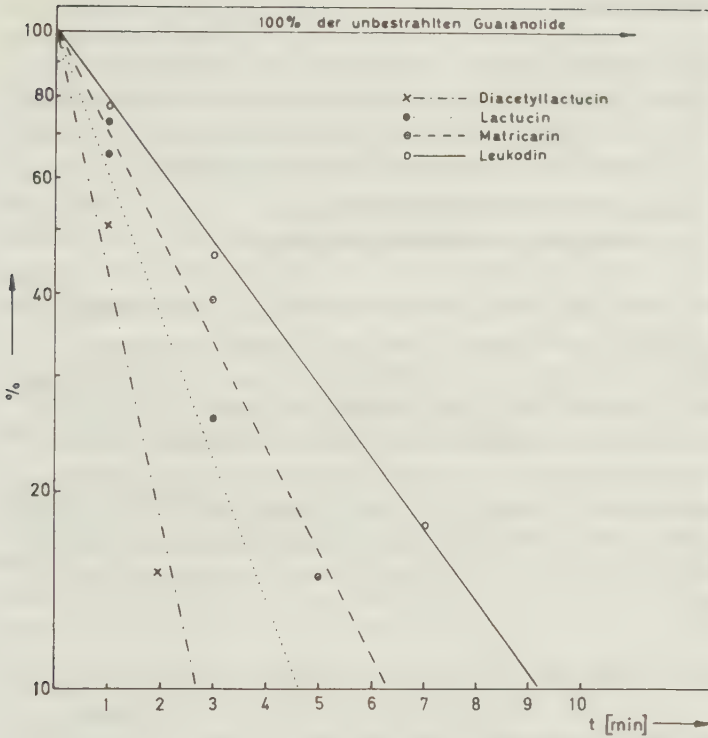


Abb. 41: Darstellung der Stabilitätsunterschiede der diskutierten Guaianolide

Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungsreihe:

Die Auswertung der gefundenen Meßwerte und ihre graphische Darstellung ergab die folgende Reihenfolge der Guaianolide in ihrer Lichtempfindlichkeit:

Leukodin < Matricarin, < Lactucin < Diacetyllactucin.

Die Unterschiede der einzelnen Guaianolide in ihrer Stabilität gegen Lichteinwirkungen waren nicht gravierend, aber doch deutlich festzustellen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit diskutierte ich die Isolierung einiger Sesquiterpenlactone und deren fotochemisches Verhalten. Aus der Thematik abgeleitet, ergaben sich zwei zentrale Blickpunkte, unter denen die Arbeit stand:

- 1.) Die Naturstoffisolierung
- 2.) Die Stabilitätsuntersuchungen.

1.) Die bei der Isolierung von Naturstoffen auftretenden Schwierigkeiten zeigte ich an der Darstellung der Guaianolide der *Matricaria chamomilla* L. auf. Der nach Šorm et al. (14) bekannte Aufarbeitungsweg wurde von mir nachgearbeitet und die resultierenden Extraktionsphasen einer Beurteilung unterzogen. Mit der Hilfe der DC und der spektralfotometrischen Gesamtazulen-Bestimmung konnte ich am Beispiel Matricin das Verhalten dieses Sesquiterpenlactones, seine Reinigung und Anreicherung im Aufarbeitungsweg darstellen.

Durch Heranziehung der präparativen Schichtchromatographie konnte ich eine neue Möglichkeit zur schnellen Erfassung sämtlicher chamazulenoider Verbindungen in Kamillenextrakten und -präparaten schaffen. Nach dieser Methode isolierte ich die Guaianolide Matricin und Matricarin.

Im weiteren Arbeitsverlauf legte ich die Bedingungen einer DC-Untersuchung fest, die eine reproduzierbare Auftrennung der chamazulenoiden Verbindungen in Kamillenpräparaten erlauben. Die Rf-Werte für Matricin, Matricarin, Chamazulencarbonsäure und Chamazulen wurden festgehalten. So war die Voraussetzung gegeben, daß ich zu Literaturzitaten über die Thematik der DC-Beurteilung von Kamillenzubereitungen kritisch Stellung nehmen konnte.

2.) Zur Klärung der Stabilität der diskutierten Guaianolide untersuchte ich ihr fotochemisches Verhalten. Der Ausgangspunkt zu diesem Arbeitskomplex war durch die Instabilität des pharmakologisch wertvollen Lactucins fixiert. Sein

fotochemisches Verhalten wird durch die im Molekül enthaltene Struktur der α, β ungesättigten Carbonylgruppe bestimmt. Für eine umfassende Aussage über die Stabilität dieser Stoffklasse wurden die Guaianolide Matricarin, Leukodin und Diacetyllactucin herangezogen, da sie einen, dem Lactucin entsprechenden Molekülaufbau besitzen. In einem Versuchskomplex konnte ich die Lichtempfindlichkeit dieser Sesquiterpenlactone darstellen. Eine vergleichende Betrachtung erbrachte folgende Reihenfolge für die Stabilität der diskutierten Guaianolide:

Leukodin < Matricarin < Lactucin < Diacetyllactucin.

Die Unterschiede in der Stabilität waren zwar nicht gravierend, aber doch eindeutig festzustellen.

Meine Untersuchungen ergaben weiterhin, daß die Wahl der Lösungsmittel als Reaktionsmilieu auf den Ablauf der Fotoreaktion einen Einfluß ausübte. Eine Gesetzmäßigkeit für den Lösungsmiteleinfluß ergab sich nicht. Auch die Bedeutung des Wassergehaltes im alkoholischen Reaktionsmedium konnte nur als reines Versuchsergebnis beschrieben werden.

Aus bestrahlten methanolischen Lösungen der Guaianolide Diacetyllactucin und Leukodin konnte ich jeweils ein fotochemisches Folgeprodukt als Reinsubstanz gewinnen. Zur Charakterisierung der beiden Fotoprodukte erarbeitete ich Beiträge. Das Leukodin-Fotoprodukt wurde eindeutig als ein Methanoladdukt erkannt.

3.) Die diskutierten Guaianolide wurden als äußerst lichtempfindliche Substanzen erkannt. Neue pharmakologische Untersuchungen werden zeigen, ob Zusammenhänge zwischen der Lichtempfindlichkeit der Guaianolide und ihrer Arzneimittelwirkung (Lactucin) bestehen. Für die galenische Zubereitung des pharmakologisch wertvollen Lactucins sind die entsprechenden Folgerungen zu ziehen. Durch die neuen pharmakologischen Untersuchungen wird sich zwangsläufig die Forderung nach einer praktikablen Lactucin-Gehaltsbestimmung ergeben. Eine für diese Untersuchungen ausreichende Genauigkeit von $\pm 15\%$

müßte eventuell durch chromatographische Methoden zu erreichen sein.

Von Bedeutung scheint mir die Ausarbeitung eines gaschromatographischen Verfahrens zur präparativen Trennung der Guaianolide zu sein. Einerseits dürfte sich hieraus eine Gehaltsbestimmung entwickeln lassen und andererseits eine Methode zur präparativen Aufarbeitung einer fotochemisch behandelten Guaianolidlösung. Eine vollständige Klärung über sämtliche entstandenen fotochemischen Folgeprodukte erscheint mir nach dieser Methode eher gegeben als mit den Methoden der herkömmlichen chromatographischen Verfahren.

Beachtung sollte weiterhin die Tatsache finden, daß die Guaianolide nicht nur durch UV-Licht einer Zerstörung unterliegen, sondern auch durch normales Tageslicht zerstört werden, obwohl sie in diesem Bereich keine Absorption zeigen.

EXPERIMENTELLER TEIL

VIII. EXPERIMENTELLER TEIL

Inhaltsverzeichnis des experimentellen Teiles:

	<u>Seite</u>
1. Allgemeine Erläuterungen	80
2. Charakterisierende Daten der eingesetzten Guaianolide und der isolierten Fotoprodukte	80
2.5. Prüfung mit dem EP-Reagens auf azulenoide Verbindungen	82
3. Herstellung des Petrolätherextraktes (A)	82
4. Die Beurteilung der einzelnen Extraktionsphasen	83
5. Die Isolierung von Matricin und Matricarin aus dem Rückstand (D) des Trennungsganges nach Šorm et al. (14) (30) durch präparative Schichtchromatogra- phie	84
6. Modifikation der präparativen Schichtchromato- graphie	85
7. Kristallisation von Matricarin	86
8. DC-Untersuchung von handelsüblichen Kamillen- präparaten	87
9. Gewinnung eines Trockenextraktes aus dem Milchsaft der <i>Lactuca virosa</i>	87
10. Herstellung von Rohlactucin nach G. Schenck et al. (54)	87
11. Rohlactucin-Reinigung durch Kristallisation	88
12. Die Acetylierung von Lactucin	88
13. Versuche zur Feststellung des fotochemischen Ver- haltens der Guaianolide	89
14. Vergleichende Untersuchungen über die Geschwindig- keit der Zerstörung der einzelnen Guaianolide	90
15. Die präparative Darstellung der Fotoprodukte	90
15.1. Das Fotoprodukt ① des Diacetyllactucins	90
15.2. Das Fotoprodukt ② des Leukodins	91
Analysenergebnisse	91

1. Allgemeine Erläuterungen

Im experimentellen Teil beschreibe ich grundsätzlich nur die Versuche, die einer genauen Schilderung ihrer Durchführung bedürfen. Versuchsreihen, deren Durchführung sich eindeutig aus den Ausführungen der speziellen Kapitel III bis VI ersehen läßt, werden an dieser Stelle nicht noch einmal aufgeführt. Mit einem Stichwort wird dann auf den betreffenden Abschnitt des einzelnen Kapitels hingewiesen. Auch die Reihenfolge der Versuche ist keine streng chronologische. Analoge Versuchsreihen werden des öfteren in einer Zusammenstellung wiedergegeben. Weiterhin gelten für die Durchführung der Versuche einige Voraussetzungen, die an dieser Stelle zusammengefaßt wiedergegeben sind:

1.1. ..egen der großen Lichtempfindlichkeit der Guaianolide wurden die Versuche stets weitgehendst unter Lichtausschluß durchgeführt.

1.2. Die zur Anwendung gelangten Lösungsmittel waren stets peroxidfrei. Ihre Reinigung wurde nach den allgemein bekannten Vorschriften durchgeführt.

1.3. Die Herstellung optisch reiner Lösungsmittel zur Spektrenaufnahme erfolgte säulenchromatographisch (Aluminiumoxid Woelm, Aktivität I nach Brockmann) (78) (79) (80).

2. Charakterisierende Daten der eingesetzten Guaianolide und der isolierten Fotoprodukte

2.1. Die Schmelzpunktbestimmungen wurden mit dem Kofler Heiztisch-Mikroskop und unkorrigiertem Thermometer durchgeführt.

78) G. Hesse, J. Daniel, G. Wohlleben, Ang. Chem. 64, 103, 1952

79) G. Hesse, H. Schildknecht, Ang. Chem. 67, 737, 1955

80) G. Wohlleben, Ang. Chem. 67, 741, 1955

2.2. Die Ultraviolett-Absorptionsspektren wurden mit einem Zeiss Spektralfotometer M 4 Q III zwischen 300 und 200 nm in Quarzküvetten von 1,000 cm Schichtdicke aufgenommen. Gemessen wurden Lösungen der Konzentration von etwa 10y/ml.

2.3. Die IR-Spektren der Guaianolide und ihrer Fotoprodukte wurden mit einem Gerät 21 der Firma Perkin-Elmer in KBr aufgenommen.

2.4. Die Dünnschichtchromatographie wurde nach den allgemein-gültigen Vorschriften für das dünn-schichtchromatographische Arbeiten durchgeführt. Die Laufmittel wurden in Vorversuchen durch eine Chromatographie mit Mikroplatten (Objektträger) gefunden. Als Entwicklungskammern benutzte ich hierfür die verschließbaren Faber-Kammern. Die angewandten Laufmittelmengen betrugen etwa 2 ml und wurden mit einer Injektionsspritze dosiert. Die Laufzeit betrug etwa 1 - 2 Minuten. Die in dieser Mikrotechnik erzielten Daten wurden dann auf die Chromatographie mit Platten der normalen Größe von 20 x 20 cm übertragen und waren gut reproduzierbar.

Die benutzten Adsorbentien Kieselgel HF 254 und Kieselgel GF 254 waren Handelsprodukte der Firma E. Merck, Darmstadt.

Die Detektion war bei der Anwendung der genannten Adsorbentien grundsätzlich mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm möglich. Häufig wurden jedoch Sprühreagenzien zur Detektion benutzt, und zwar das EP-Reagens für die azulenoiden Verbindungen der *Matricaria chamomilla* L. und das Phenolreagens nach Folin-Ciocalteu für die Guaianolide Lactucin, seine Diacetylverbindung und Leukodin.

Das EP-Reagens setzt sich nach E. Stahl (34) wie folgt zusammen:

0,25 g p-Dimethylaminobenzaldehyd
50,00 g 96%ige Essigsäure
5,00 g 85%ige Phosphorsäure
44,00 g destilliertes Wasser

Zur Reagensdarstellung wurde der Aldehyd in der Mischung der Säuren gelöst und mit dem Wasser versetzt.

In der DC wurde das EP-Reagens als Sprühdetektionsmittel eingesetzt. Eine Farbtintensivierung erfolgte durch kurzzeitiges Erhitzen auf 100°C oder nach der Einwirkung von Wasserdampf auf die Adsorptionsschicht der DC-Platte.

Das Phenolreagens nach Folin-Ciocalteu war ein Handelsprodukt der Firma E. Merck Darmstadt. Wurde die DC-Platte mit diesem Reagens besprüht, so färbten sich die Guaianolidflecke leicht gelb an. Nach dem Lufttrocknen der besprühten Adsorptionsschicht der DC-Platte wurde sie etwa 5 Minuten lang dem Einfluß von Ammoniakdämpfen ausgesetzt, wobei die leicht gelbgefärbten Guaianolidflecke eine grau-blaue Farbe annahmen.

2.5. Prüfung mit dem EP-Reagens auf azulenoide Verbindungen

Das EP-Reagens kann auch Verwendung finden zur Durchführung einer Vorprobe auf azulenoide Verbindungen. Wenige Kamillenblüten (oder Extrakt) wurden in 5 ml Äther erwärmt. Nach einer Filtration wurde die Ätherphase eingedampft und der Rückstand mit 3 ml Reagens 5 Minuten lang im Wasserbad erhitzt. Eine entstandene Blaufärbung zeigte den positiven Reaktionsverlauf, das Vorhandensein von chamazulenoiden Verbindungen an.

3. Herstellung des Petrolätherextraktes (A)

Die Herstellung des Petrolätherextraktes (A) erfolgte aus 5 kg getrockneten und gemahlenen Blütenkörbchen fränkischer Kamillen durch kombinierte Mazeration-Perkolation in Perkolatoren von 5 l Fassungsvermögen. Die Quellungsdauer betrug 15 Stunden, die Mazerationsdauer 48 Stunden. Die Perkolation wurde abgebrochen, nachdem eine Probe auf azulenoide Verbindungen mit dem EP-Reagens negativ verlief. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 15 - 20 Tropfen/Minute. Die vereinigten Perkolate wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und ergaben 243 g dunkelgelb-grünen, viskosen Rückstand. Dieser wurde mit Petroläther zur 10%igen Lösung (A) aufgenommen.

Die Petrolätherlösung (A) wurde zur Aufarbeitung nach Šorm et al. (14) (30) (Tabelle 4) zehnmal mit einem Liter einer 2%igen KHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten KHCO_3 -Phasen ergaben die Lösung (B). Sie wurde über 8 Stunden im Perforator nach Kutscher-Steudel mit Äther ausgezogen. Die Ätherlösung lieferte nach Evaporation 9,7 g dunkelgelben, viskosen Rückstand (D). Eine Kristallisation von Matricin aus dem Rückstand (D) mit Äthanol und anschließend mit Aceton/Diiso-propyläther mißlang. Es entstanden ausschließlich amorphe Niederschläge, die anschließend mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie gereinigt wurden. Der in Alkohol unlösliche Rückstand der Phase (D) ergab nach der Vereinigung mit den eingeengten Mutterlaugen 4,2 g eines gelbbraunen, viskosen Rückstandes, der an neutralem Aluminiumoxid (Woelm, Aktivität IV nach Brockmann) chromatographiert wurde. Er wurde als 50%ige Lösung (in Petroläther) mit Aluminiumoxid zu einem Brei verrieben, der auf die präparierte Säule aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte mit Petroläther, Petroläther mit steigendem Anteil Benzol, mit Benzol und Benzol mit steigendem Anteil Äther. Fraktionen von 20 ml Volumen wurden im Fraktionssammler aufgefangen. Nach entsprechender Einengung erfolgte die Fraktionskontrolle durch eine Spektromaufnahme im Bereich von 260 bis 240 nm und durch die DC. Matricarin konnte nicht isoliert werden.

4. Die Beurteilung der einzelnen Extraktionsphasen

Gehaltsbestimmung an Gesamtazulen:

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte nach Ziffer 85 der allgemeinen Vorschriften des DAB 7 (Monographien). 5,00 g Droge (oder eine entsprechende Extraktmenge) wurden mit 300 ml destilliertem Wasser in der gereinigten Neo-Clevenger-Apparatur unter häufigem Umschwenken erhitzt und 3 Stunden lang destilliert. Als Vorlage dienten 2,00 ml Xylol. Unter Berücksichtigung eines Xylolwertes (Blindversuch) wurden Vol.-Prozent äth. Öl in der Droge erfaßt. Durch Messung der Extinktion bei 605 nm ließ sich dann der Gesamtazulengehalt bestimmen.

Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in der Tabelle 5 wiedergegeben. Ihre Berechnung erfolgte nach der von Kaiser und Frey (35) aufgestellten Formel.

Formel nach Kaiser und Frey:

$$\text{Gehalt Azulen in \%} = \frac{E \cdot L \cdot 5,81}{D \cdot A \cdot 100}$$

E = Extinktion

L = angewendete Menge Lösungsmittel in ml

D = Küvettenschichtdicke

A = Einwaage (g)

5. Die Isolierung von Matricin und Matricarin aus dem Rückstand (D) des Trennungsganges nach Sorm et al. (14) (30)
durch präparative Schichtchromatographie

Durchführungstechnik:

Chromatographiert wurde an Platten der Größe 1 m x 20 cm. Adsorptionsmaterial war Kieselgel HF 254 in einer Schichtdicke von 1,2 - 1,5 cm. Die Beschichtung der Platten erfolgte ohne Streichgerät nach dem Trogverfahren (Abb. 42).

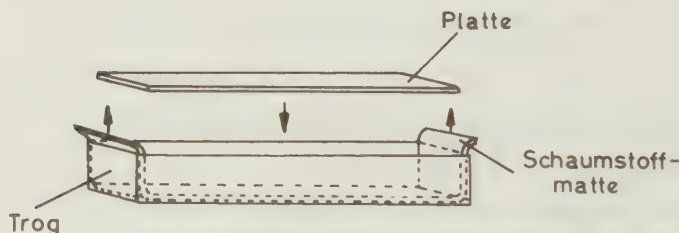


Abb.42: Beschichtung der SC-Platten im Trogverfahren

Die gereinigten Platten wurden in einen aus Plastikwerkstoff selbstgefertigten Trog gegeben. Sie ruhten auf einer Schaumstoffmatte. 300 g Kieselgel und 550 ml destilliertes Wasser wurden mit einem Rührfix gleichmäßig gemischt und ergaben,

auf der Platte durch vorsichtige Schwenkbewegungen verteilt, die Adsorptionsschicht. Nach einstündigem Trocknen konnte die Platte mit Hilfe der Schaumstoffmatte aus dem Trog entfernt werden. Nach 24stündiger Lufttrocknung war die Platte gebrauchsfertig. Man erreichte mit dieser Methode eine ausreichend gleichmäßige, rißfreie Adsorptionsschicht. Fünf Platten können dann gleichzeitig im Chromatogrammtank entwickelt werden.

Die zu chromatographierende Lösung wurde mit einer Pipette gleichmäßig auf die Plattenlängsseite, in 3 cm Entfernung vom unteren Plattenrand, aufgetragen. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurde entwickelt. Nach der Entwicklung und dem Abdunsten des Laufmittels wurde zur Detektion die Platte bis auf einen schmalen Reststreifen abgedeckt. An dem Reststreifen erfolgte die Detektion durch Besprühen mit dem EP-Reagens oder durch die Fluoreszenzlöschung im UV-Licht bei 254 nm.

Die Detektion erbrachte eine Zoneneinteilung des Chromatogrammes. Die Zonen wurden getrennt von der Platte abgehoben und mit Äther extrahiert. Die erzielten Extrakte wurden je nach der Fragestellung aufgearbeitet oder zur Kristallisation gebracht.

Versuchsbedingungen:

Ein aus 5 kg Kamillenblüten hergestellter Extrakt (A) lieferte nach Vorreinigung und Anreicherung 9,7 g Rückstand (D), der einer schichtchromatographischen Trennung durch zweimalige Entwicklung in Äther/Benzol 1:1 (V/V) unterzogen wurde. Die Zone (2) lieferte nach der Extraktion mit Äther eine Matricinphase. Die Chromatogrammzone (4) erbrachte nach der Umkristallisation aus Aceton/Diisopropyläther 11,3 mg Matricarin.

6. Modifikation der präparativen Schichtchromatographie

Ohne Vorreinigung wurde ein aus 5 kg Kamillenblüten hergestellter Extrakt (A) sofort durch präparative SC aufgetrennt.

Entwickelt wurde in mehreren Stufen in den Laufmitteln:

- 1) Benzol
- 2) Benzol
- 3) Benzol + 10 % Äther
- 4) Benzol + 30 % Äther
- 5) Benzol + 40 % Äther

Die Aufarbeitung der Chromatogrammzone ② lieferte wiederum die Matricinphase. Aus der Zone ④ wurden 14,3 mg Matricarin gewonnen. (Die Gesamtmenge des durch SC isolierten Matricarins betrug 25,6 mg).

7. Kristallisation von Matricarin:

Das unter III.3. und III.3.2. angefallene Matricarin (25,6 mg) mußte durch Kristallisation weitergehend gereinigt werden. Es wurde in Aceton gelöst und bei gleichzeitiger Filtration mit einer Ballonkapillare (Abb. 43) in ein Kristallisationsröhrchen eingebracht. Die Acetonlösung wurde eingengt und in der Hitze bis zur Trübung mit gereinigtem Diiso-propyläther versetzt. Mit wenig Aceton wurde die Trübung wieder aufgehoben. Nach der langsamen Abkühlung erfolgte bei -20°C eine Kristallisation. Die Ausbeute betrug 13,1 mg reinstes Matricarin.

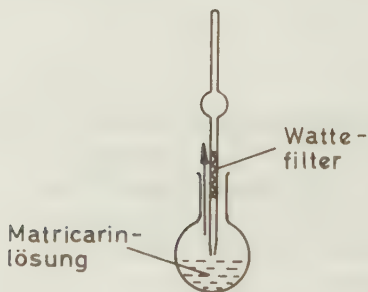


Abb.43: Ballonkapillare zum Abhebern
von Mutterlaugen

8. DC-Untersuchung von handelsüblichen Kamillenpräparaten

500 ml der Präparate Azulon[®], Kamillosan[®], Chamulen[®] und Extr. Cham. fld. Erg.-B. zum DAB 6 (nach der dort geforderten Methode hergestellt) wurden im Vakuum vorsichtig auf 50 ml eingeeengt. Nach der beschriebenen DC-Methode wurden 0,02 ml der eingeeengten Lösungen chromatographiert. Die erzielten Ergebnisse sind in der Tabelle 7 (vgl. S. 32) und die Chromatogramme in der Abb. 12 (vgl. S. 32) zusammengefaßt wiedergegeben.

9. Gewinnung eines Trockenextraktes aus dem Milchsafte der Lactuca virosa

50 g eingedickter Milchsafte wurden mit 35 ml destilliertem Wasser angeteigt und in Petrischalen über 3 - 4 Stunden bei -20°C eingefroren. In 18 - 20 Stunden wurde das Eis unter Vakuum sublimiert (Apparat Christ). Es entstand ein sehr leichtes, hellgelbes Pulver von stark bitterem Geschmack. Die Ausbeute an Trockenextrakt lag bei ca. 30%.

10. Herstellung von Rohlactucin nach G. Schenck et al. (54)

Zur Rohlactucingewinnung wurde Lactucylpulver der Knoll AG oder der besser geeignete Gefrier-Trockenextrakt aufgearbeitet.

50 g Ausgangsmaterial wurden mit 1 L dest. Wasser übergossen und unter häufigem Umschwenken 1 Stunde lang stehen gelassen. Ein 10minütiges Erwärmen auf 45 - 50°C und sofortiges Abkühlen auf 10 - 15°C brachte einen beträchtlichen Teil des Trockenpulvers in Lösung. Das Versetzen der unfiltrierten Lösung mit 10 ml rauchender Salzsäure verursachte eine flockige Trübung. Eine Filtration der Lösung vor der Salzsäurebehandlung war sehr langwierig, während nach der Säurezugabe eine schnelle Filtration möglich war, die dann ein klares, gelbliches Filtrat lieferte.

Die filtrierte, wässrige Lösung wurde mit 200 g Kochsalz versetzt. Danach erfolgte eine Zugabe von so viel einer

kaltgesättigten NaHCO_3 -Lösung, bis ein Farbumschlag der Lösung nach braun erfolgte. Diese Lösung wurde im Perforator nach Kutscher-Steudel über 30 Stunden lang mit Äther in raschem Tempo perforiert.

Die Ätherphase wurde nach Beendigung der Perforation mit Natriumsulfat getrocknet. Sie lieferte nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum das Rohlactucin als gelbe, schmierige Masse, die im Vakuumexsikkator getrocknet wurde. Die Ausbeute lag bei 7 - 9%, die bei dem Einsatz von gefriergetrocknetem Milchsaff auf 12 - 15% stieg.

11. Rohlactucin-Reinigung durch Kristallisation

1 g Rohlactucin wurde in 110 ml siedendem, destillierten Wasser gelöst und mit 30 mg gekörnter Aktivkohle durchgeschüttelt und auf eine Aluminiumoxidsäule aufgetragen. Diese Säule bestand aus 5 g schwach saurem Al_2O_3 , das in einem Chromatographierrohr zum Filter gestopft war. Die vorbereitete Säule wurde mit siedendem Wasser gewaschen. Über die heiße Säule wurde mit leichtem Unterdruck die Rohlactucinlösung filtriert und mit 10 ml siedendem Wasser nachgewaschen.

Im Filtrat bildeten sich schnell Lactucinkristalle. Nach 24stündigem Stehenlassen bei 0° - 3°C wurden die Kristalle auf einer Nutsche gesammelt. Nach einer zweiten Kristallisation erhielt ich reinweiße Kristallblättchen in einer Ausbeute von 55 - 67%.

12. Die Acetylierung von Lactucin

1 g Lactucin wurde in 7,5 ml absolutem Pyridin gelöst, mit 7,5 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 4 Stunden lang unter Eiskühlung und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser gegossen und der ausflockende Niederschlag auf einer Nutsche gesammelt. Das erzielte Rohprodukt wurde mehrfach aus Chloroform/Petroläther gefällt und ergab in 33 - 35%iger

Ausbeute die reine Diacetylverbindung.

13. Versuche zur Feststellung des fotochemischen Verhaltens der Guaianolide

Die Feststellung, ob die einzelnen Guaianolide einer fotochemischen Veränderung unterliegen, erfolgte:

- a) mit Hilfe der DC
- b) spektralfotometrisch.

a) Feststellung der Lichtempfindlichkeit der einzelnen Guaianolide durch DC.

(Vgl. für Matricarin III.7. S. 33 / für Diacetyllactucin IV.4.1. S. 44 / für Leukodin V.4. S. 62).

Auf die Startlinie der entsprechenden DC-Platten wurden in regelmäßigen Abständen bestimmte Konzentrationen der betreffenden Guaianolide aufgetragen. Jeder Startfleck wurde eine bestimmte Zeit einer UV-Bestrahlung ausgesetzt (die entsprechenden Zeiten sind für Matricarin der Abb. 13, für Diacetyllactucin der Abb. 19 und für Leukodin der Abb. 31 zu entnehmen). Danach wurde die DC-Platte entwickelt und ausgewertet.

b) Die spektralfotometrische Verfolgung der Guaianolidzerstörung.

(Vgl. für Matricarin S. 33 / für Diacetyllactucin IV.5. S. 46 / für Leukodin V.5. S. 63).

Zur spektralfotometrischen Verfolgung der jeweiligen Foto-reaktion wurde das betreffende Guaianolid in der angegebenen Konzentration in 95%igem Methanol zur Stammlösung gelöst. Die Stammlösung, stets unter Lichtausschluß aufbewahrt, ergab nach dem Verdünnen die 0,05%ige Ausgangslösung für die Bestrahlung. Nach der Fotoreaktion wurden Proben der bestrahlten Lösung weiter zur Meßlösung verdünnt (Konzentration 10γ/ml bezogen auf die Ausgangsmenge an Guaianolid). Von der Meßlösung wurde das jeweilige Absorptionsspektrum zwischen 300 und 200 nm aufgenommen. Das gemessene Absorptionsmaximum

jeder Meßlösung wurde mit den Extinktionen von unbestrahlten Guaianolidlösungen verglichen.

Als Strahlungsquelle diente eine Analysen-Quarzlampe, Koffermodell mit Hg-Hochdruckbrenner Q 81 ohne Filter, Original Hanau.

Zur Bestrahlung befanden sich die Reaktionslösungen in Bechergläsern von 50 ml Volumen, über denen senkrecht in einem Abstand von ca. 12 cm der Brenner montiert war. Das UV-Licht fiel von oben senkrecht in die offenen Gefäße. Während einer Versuchsreihe wurde ein konstanter Abstand des Brenners zur Flüssigkeitsoberfläche eingehalten. Jeweils ein Becherglas fand unter dem Brenner Platz. Sein Inhalt wurde durch einen Magnetrührer in gleichmäßiger Bewegung gehalten. Vor einer Probenentnahme wurden die verdunsteten Lösungsmittelanteile ergänzt. Da eventuelle Ermüdungserscheinungen des UV-Brenners während der kurzen Zeiteinheiten einer Versuchsreihe in engen Grenzen geblieben sein dürften, konnte als sicher angenommen werden, daß während einer Versuchsreihe die Bestrahlungsbedingungen konstant geblieben waren.

14. Vergleichende Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Zerstörung der einzelnen Guaianolide

Jeweils 50 ml einer etwa 0,05%igen Lösung jedes Guaianolides (in 95%igem Methanol) wurden in einer Versuchsreihe der Fotoreaktion ausgesetzt. Die Reaktion wurde immer dann abgebrochen, wenn mindestens 90% des eingesetzten Guaianolides zerstört waren. Die Messungen erfolgten unmittelbar hintereinander, ohne daß der Brenner ausgeschaltet wurde oder äußere Bedingungen verändert wurden. So waren für jede Guaianolidlösung gleiche Reaktionsbedingungen gegeben.

15. Die präparative Darstellung der Fotoprodukte

15.1. Das Fotoprodukt (1) des Diacetyllactucins:

Für die Bestrahlungslösung von 50 mg Diacetyllactucin in

100 ml 95%igem Methanol war die Fotoreaktion nach 16 - 20 Minuten beendet. Bestrahlt wurden 15 Ansätze solcher Guaianolidlösung. Nach Reaktionsende eines jeden Ansatzes wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Die einzelnen Rückstände wurden nach Beendigung der Versuchsreihe vereinigt und erbrachten nach der beschriebenen Kristallisation (vgl. S. 51) 127,5 mg reines Fotoprodukt (1) .

15.2. Das Fotoprodukt (2) des Leukodins:

Zur Isolierung wurden 10 Ansätze von 50 ml einer 0,1%igen methanolischen (95%iger Methanol) Leukodinlösung bestrahlt. Die Reaktionszeit für den einzelnen Ansatz betrug etwa 15 Minuten. Die vereinigten Rückstände der Bestrahlungslösungen wurden in warmem Benzol gelöst, mit wenig Aktivkohle behandelt und filtriert. Die filtrierte, warme Lösung wurde mit soviel Petroläther versetzt, bis eine schwache Trübung auftrat. Durch eine erneute Zugabe von einigen Tropfen Benzol wurde die Trübung wieder aufgehoben und der so behandelte Ansatz zum Auskristallisieren zur Seite gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Kristalle auf einer Nutsche gesammelt. Die Ausbeute betrug 94,34 mg des Fotoproduktes (2) .

Analysenergebnisse:

Das Molekulargewicht des isolierten Fotoproduktes des Leukodins wurde durch ein Massenspektrum bestimmt und ergab einen Wert von 278. Die Spektrumaufnahme erfolgte durch die Firma Schering AG Berlin.

Eine C,H-Elementaranalyse, ausgeführt durch das Mikroanalytische Labor Ilse Beetz, Kronach/OFr., ergab die Werte für: C = 69,28% und H = 7,77%. Aus dem Massenspektrum ergab sich das Molekulargewicht für ein Methanoladdukt, so daß berechnet werden konnte für: C = 69,32% und H = 7,64%.

Lebenslauf

Am 3. April 1937 wurde ich, Wolfgang Rieck, als Sohn des Färbermeisters Fritz Rieck und seiner Ehefrau Lieselotte, geb. Haase, in Stralsund geboren.

Im Anschluß an die Volksschule Stralsund besuchte ich die Walther-Rathenau-Oberschule in Berlin-Wilmersdorf, an der ich im März 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Unmittelbar darauf trat ich in die Minerva-Apotheke in Berlin-Charlottenburg als Praktikant ein. Im März 1960 bestand ich die pharmazeutische Vorprüfung. Nach einer Wartezeit von einem halben Jahr konnte ich zum Wintersemester 1960/61 an der Technischen Universität Berlin mein Studium der Pharmazie aufnehmen. Nach dem zweiten Semester wechselte ich an das Pharmazeutische Institut der Freien Universität Berlin und bestand im Frühjahr 1964 die pharmazeutische Staatsprüfung.

Im Herbst 1964 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Schenck mit der Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit.

Berlin, im April 1968

Druck: Omnia - Organisation G. m. b. H.
Berlin 31 · Hohenzollerndamm 174
Telefon: 87 93 12

